



**HAL**  
open science

**Ecodynamique des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) et des communautés microbiennes dans des sols à pollution mixte (HAP, métaux) avant et après traitement par biopile et par désorption thermique : influence de la rhizosphère et de la mycorhization**

Marie-Paule Norini

► **To cite this version:**

Marie-Paule Norini. Ecodynamique des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) et des communautés microbiennes dans des sols à pollution mixte (HAP, métaux) avant et après traitement par biopile et par désorption thermique : influence de la rhizosphère et de la mycorhization. Biologie végétale. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2007. Français. NNT : 2007NAN10121 . tel-01748240

**HAL Id: tel-01748240**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748240v1>**

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse  
présentée pour l'obtention du titre de  
Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I  
en Géosciences

par Marie-Paule NORINI

**Ecodynamique des Hydrocarbures Aromatiques  
Polycycliques (HAP) et des communautés microbiennes  
dans des sols à pollution mixte (HAP, métaux) avant et  
après traitement par biopile et par désorption thermique:  
Influence de la rhizosphère et de la mycorhization**

**Soutenance publique le 15 novembre 2007 devant le jury:**

Rapporteurs: M. Joner Erik, chercheur, Bioforsk, Oslo  
M. Van Tuinen Diederik, CR INRA, Dijon

Examineurs: M. Morel Jean-Louis, Professeur INPL, Nancy  
M. Soulas Guy, DR INRA, Talence

Directrice de thèse: Mme Leyval Corinne, DR CNRS, Nancy

**LIMOS**

**Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique  
dans les Sols UMR 7137**



Thèse  
présentée pour l'obtention du titre de  
Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I  
en Géosciences

par Marie-Paule NORINI

**Ecodynamique des Hydrocarbures Aromatiques  
Polycycliques (HAP) et des communautés microbiennes  
dans des sols à pollution mixte (HAP, métaux) avant et  
après traitement par biopile et par désorption thermique:  
Influence de la rhizosphère et de la mycorhization**

**Soutenance publique le 15 novembre 2007 devant le jury:**

Rapporteurs: M. Joner Erik, chercheur, Bioforsk, Oslo  
M. Van Tuinen Diederik, CR INRA, Dijon

Examineurs: M. Morel Jean-Louis, Professeur INPL, Nancy  
M. Soulas Guy, DR INRA, Talence

Directrice de thèse: Mme Leyval Corinne, DR CNRS, Nancy

**LIMOS**

**Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique  
dans les Sols UMR 7137**



« Le monde est un miracle si fantastique qu'on ne sait pas s'il faut en rire ou en pleurer »

**Jostein Gaarder, Dans un miroir obscur.**

« Comme il est profond ce mystère de l'invisible ! Nous ne le pouvons sonder avec nos sens misérables, avec nos yeux qui ne savent apercevoir ni le trop petit, ni le trop grand, ni le trop loin, ni les habitants d'une étoile, ni les habitants d'une goutte d'eau...avec nos oreilles qui nous trompent, car elles nous transmettent les vibrations de l'air en notes sonores. Elles sont des fées qui font changer le bruit, ce mouvement, et par cette métamorphose donnent naissance à la musique, qui rend chantante l'agitation muette de la nature...avec notre odorat, plus faible que celui du chien...avec notre goût qui peut à peine discerner l'âge du vin... »

**Guy de Maupassant, Le Horla.**





« Dans la vie, les hommes sont tributaires les uns des autres.  
Il y adonc toujours quelqu'un à maudire ou à remercier. »  
**Madeleine Ferron, Les chemins des dames.**

« Il n'est de leçon à tirer que de l'expérience. Toute  
construction purement intellectuelle est vaine. »  
**Antoine de Saint Exupery, Vol de Nuit.**

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire des Interactions Micro-organismes-Minéraux-Matière organique dans les sols (LIMOS)...ce manuscrit est ainsi le fruit du travail réalisé lors de mon doctorat mais il est également issu de la participation de l'ensemble du personnel du LIMOS, qui chacun à leur manière, ont rendu cette thèse possible... c'est un peu comme pour un film, ce que vous voyez n'est qu'une infime partie de ce qui a été nécessaire pour y arriver...alors merci à tous et à toutes, ce travail est en partie le votre...

Je tiens tout d'abord à remercier Corinne Leyval, ma directrice de thèse, directrice de recherches au CNRS, directrice du LIMOS, pour l'ensemble des connaissances qu'elle m'a transmis, pour sa disponibilité ainsi que pour les compétences qu'elle m'a permis d'acquérir.

Mes plus sincères remerciements vont aux deux personnes qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail, Erik Joner, chercheur au Biosforsk d'Oslo et Diederik Van Tuinen, chargé de recherches à l'INRA de Dijon. Je les remercie pour m'avoir fait profiter de leurs expériences et apprécie les commentaires constructifs qu'ils m'ont fourni.

J'adresse également mes remerciements à Jean-Louis Morel, professeur à l'INPL de Nancy, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Je remercie également M Guy Soulas, directeur de recherche à l'INRA de Talence, pour avoir accepté de juger ce travail.

Merci chaleureusement à mes relecteurs (et -trices)...merci pour les regards critiques qui m'ont particulièrement aidé.

Plein de mercis vont également à Thierry Béguiristain et Aurélie Cébron avec qui j'ai eu la chance de travailler pendant cette thèse. Merci pour leur aide et pour tous ces petits conseils toujours utile, ainsi que leur gentillesse et leur humour (Haute saonnois parfois...). Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude.

« La reconnaissance est la mémoire du cœur. » **Hans Christian Andersen**

Je tiens aussi à remercier l'ensemble du laboratoire LIMOS personnels permanents, doctorants, stagiaires... qui ont contribué au bon déroulement de ce travail !!! Je tiens à remercier les uns et les autres pour leur aide et leur bonne humeur quotidienne.

« Ce sont toutes ces petites complicités, ces attentions discrètes, ces centaines de sourires qui ont façonné ma vie. Merci ! »

**Emilie Delarue**

Petite note particulière pour Stéphane (un « Dieu » « Crétin ») et Céline (« Actibus immensis urbs fulget massiliensis »)...merci pour votre amitié et votre présence...pour le reste, vous le savez déjà !!!

« Ce sont mes amis qui m'ont fait aimer la vie. Ils me rendent meilleur à mesure que je les trouve meilleurs eux-mêmes ; »

**Jacques Chardonne**

Je ne pourrais terminer mes remerciements sans y associer mon entourage familial et affectif dont le soutien, dans les bons comme les mauvais moments, m'a permis de mener ce travail à son terme... qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance et de mon affection... je vous aime fort. Une pensée également à ceux qui ne sont plus à mes côtés, mais qui sont dans mon coeur ...

« Je sais pas comment te dire  
Ce que je peux pas écrire  
Faudrait que j'invente des mots  
Qu'existent pas dans le dico  
C'est toi que je t'aime  
(vachement beaucoup) »

**Les Inconnus**





## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION GENERALE – CONTEXTE DE L’ETUDE</b> .....	<b>1</b>
 <b>PARTIE I: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>1. LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES-GENERALITES</b> .....	<b>5</b>
1.1. DEFINITION – CLASSIFICATION.....	5
1.2. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES HAP .....	6
1.3. ORIGINE DES HAP.....	7
1.4. TOXICITE DES HAP.....	8
1.5. DISTRIBUTION DES HAP.....	10
1.6. LES MULTIPOLLUTIONS.....	12
1.7. SITES POLLUES.....	13
<b>2. DEVENIR DES HAP DANS L’ENVIRONNEMENT</b> .....	<b>18</b>
2.1. CONSEQUENCES DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES SUR LE DEVENIR DES HAP .....	18
2.2. DISSIPATION DES HAP.....	21
2.2.1. <i>Voies abiotiques de dégradation des HAP</i> .....	21
2.2.2. <i>Voies biotiques de dégradation des HAP</i> .....	23
<b>3. LES HAP DANS LA RHIZOSPHERE</b> .....	<b>32</b>
3.1. TERMINOLOGIE.....	33
3.2. ORGANISMES DE LA RHIZOSPHERE.....	33
3.2.1. <i>Les plantes</i> .....	33
3.2.2. <i>Les microorganismes de la rhizosphère</i> .....	35
3.2.3. <i>Les champignons mycorhiziens à arbuscules</i> .....	37
3.3. INTERACTIONS ENTRE LES MICROORGANISMES.....	40
3.3.1. <i>Effets des champignons MA sur les communautés bactériennes</i> .....	40
3.3.2. <i>Effets des communautés bactériennes sur les champignons MA</i> .....	41
3.3.3. <i>Interactions entre champignons MA et bactéries fixatrices d’azote</i> .....	41
3.4. DEVENIR DES HAP DANS LA RHIZOSPHERE.....	42
3.4.1. <i>Dissipation</i> .....	42
3.4.2. <i>Adsorption et absorption</i> .....	43
3.4.3. <i>Dégradation par les plantes et rôle des microorganismes de la rhizosphère</i> .....	44
<b>4. TRAITEMENTS</b> .....	<b>47</b>
4.1. REMISE EN ETAT DES SOLS POLLUES ET TECHNIQUES DE DEPOLLUTION.....	47
4.2. TRAITEMENTS PHYSICO-CHIMIQUES .....	47
4.3. TRAITEMENTS BIOLOGIQUES.....	49
 <b>PARTIE II: MATERIELS ET METHODES</b>	
<b>1. MATERIELS</b> .....	<b>53</b>
1.1. SITES ET SOLS ETUDIES.....	53
1.1.1. <i>Site industriel d’Homécourt</i> .....	53
1.1.2. <i>Site industriel de Neuves-Maisons</i> .....	55
1.1.3. <i>Prélèvements et caractérisation des sols utilisés</i> .....	56
1.2. DISPOSITIF LYSIMETRIQUE EXPERIMENTAL IN SITU .....	59
1.3. MATERIEL BIOLOGIQUE.....	60
1.3.1. <i>La luzerne</i> .....	60
1.3.2. <i>Champignon mycorhizien à arbuscules</i> .....	61
<b>2. METHODES</b> .....	<b>61</b>
2.1. ETUDES AU LABORATOIRE .....	61
2.1.1. <i>Mise en place des cultures</i> .....	62
2.1.2. <i>Conduite des cultures</i> .....	63
2.1.3. <i>Arrêt des cultures</i> .....	64

## Table des matières

2.2.	PRELEVEMENTS IN SITU .....	65
2.2.1.	<i>Prélèvements de sol des parcelles expérimentales d'Homécourt</i> .....	65
2.2.2.	<i>Prélèvements de sol de Neuves-Maisons après traitement par désorption thermique</i> .....	66
2.3.	ANALYSES .....	66
2.3.1.	<i>Analyses biologiques</i> .....	66
2.3.2.	<i>Analyses microbiologiques : dénombrement bactérien en plaques de microtitration</i> .....	68
2.3.3.	<i>Analyses moléculaires</i> .....	70
2.3.4.	<i>Analyses physico-chimiques</i> .....	82
2.3.5.	<i>Analyses statistiques</i> .....	84
2.3.6.	<i>Indices de diversité</i> .....	85

### **PARTIE III: RESULTATS ET DISCUSSIONS**

#### **PARTIE III Chapitre I: CARACTERISATION DE LA POLLUTION ET DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES CINQ SOLS ETUDIES**

INTRODUCTION .....		87
<b>1.</b>	<b>TENEURS EN POLLUANTS</b> .....	<b>88</b>
1.1.	HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES .....	88
1.2.	ELEMENTS EN TRACE METALLIQUES .....	90
<b>2.</b>	<b>PARAMETRES BIOLOGIQUES</b> .....	<b>94</b>
2.1.	TAUX DE GERMINATION DE LA LUZERNE .....	94
2.2.	DENOMBREMENT DE BACTERIES CULTIVABLES ET DEGRADANT LES HAP .....	95
2.3.	QUANTIFICATION DES GENES 16S ET DE GENES DE DEGRADATION DES HAP .....	96
<b>3.</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>98</b>
3.1.	CONTAMINATION EN HAP ET EN ETM DES SOLS ETUDIES .....	98
3.2.	GERMINATION DE LA LUZERNE DANS LES SOLS ETUDIES .....	100
3.3.	MICROFLORE CULTIVABLE ET DEGRADANT LES HAP DANS LES SOLS ETUDIES .....	100
CONCLUSION .....		102

#### **PARTIE III Chapitre II: DYNAMIQUE DES POLLUANTS ET DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DANS LA RHIZOSPHERE DE LUZERNE MYCORHIZEE OU NON: CAS DES SOLS CONTAMINES ET TRAITE DU SITE D'HOMECOURT**

INTRODUCTION .....		103
<b>1.</b>	<b>CONDUITE DE L'EXPERIENCE</b> .....	<b>103</b>
<b>2.</b>	<b>RESULTATS</b> .....	<b>104</b>
2.1.	CROISSANCE DES PLANTES .....	104
2.1.1.	<i>Survie des plantes</i> .....	104
2.1.2.	<i>Biomasse des plantes</i> .....	105
2.2.	NUTRITION MINERALE .....	106
2.2.1.	<i>Teneur en phosphore</i> .....	106
2.2.2.	<i>Teneur en éléments majeurs</i> .....	109
2.3.	PARAMETRES MICROBIOLOGIQUES .....	109
2.3.1.	<i>Estimation de la colonisation mycorhizienne</i> .....	109
2.3.2.	<i>Structure des communautés microbiennes dans le sol</i> .....	114
2.4.	DEVENIR DES POLLUANTS .....	121
2.4.1.	<i>Teneur en HAP dans le sol après culture</i> .....	121
2.4.2.	<i>Teneur en zinc dans les plantes</i> .....	124
<b>3.</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>126</b>
3.1.	CROISSANCE DES PLANTES ET NUTRITION MINERALE .....	126
3.1.1.	<i>Influence des différents sols</i> .....	126
3.1.2.	<i>Impact de la mycorhization et de la fertilisation</i> .....	128
3.2.	MICROFLORE RHIZOSPHERIQUE DANS LES SOLS A L'ISSUE DE LA CULTURE .....	129
3.2.1.	<i>Colonisation mycorhizienne</i> .....	129

3.2.2.	<i>Structure des communautés bactériennes et fongiques dans les sols à l'issue de la culture</i>	132
3.3.	DEVENIR DES POLLUANTS A L'ISSUE DE LA CULTURE	134
3.3.1.	<i>Les HAP</i>	134
3.3.2.	<i>Les ETM</i>	137
<b>CONCLUSION</b>		<b>138</b>

**PARTIE III Chapitre III: DYNAMIQUE DES POLLUANTS ET DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DANS LA RHIZOSPHERE DE LUZERNE MYCORHIZEE OU NON: CAS DES SOLS CONTAMINES ET TRAITE DU SITE DE NEUVES-MAISONS**

<b>INTRODUCTION</b>		<b>139</b>
<b>1.</b>	<b>CONDUITE DE L'EXPERIENCE</b>	<b>139</b>
<b>2.</b>	<b>RESULTATS</b>	<b>140</b>
2.1.	CROISSANCE DES PLANTES	140
2.1.1.	<i>Survie des plantes</i>	140
2.1.2.	<i>Biomasse des plantes</i>	141
2.1.3.	<i>Mesure du pH dans le sol après culture</i>	143
2.2.	NUTRITION MINERALE	143
2.2.1.	<i>Teneur en phosphore</i>	143
2.2.2.	<i>Teneurs en éléments majeurs</i>	144
2.3.	PARAMETRES MICROBIOLOGIQUES	147
2.3.1.	<i>Estimation de la colonisation mycorhizienne</i>	147
2.3.2.	<i>Analyses microbiologiques des sols après culture de la luzerne</i>	148
2.4.	DEVENIR DES POLLUANTS	150
2.4.1.	<i>Teneurs en HAP dans le sol après culture</i>	150
2.4.2.	<i>Teneurs en éléments en traces et en métalloïde</i>	153
<b>3.</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>155</b>
3.1.	COLONISATION MYCORHIZIENNE DANS LES SOLS DE NEUVES-MAISONS	155
3.2.	MICROFLORE BACTERIENNE DANS LES SOLS DE NEUVES-MAISONS A L'ISSUE DE LA CULTURE DE LA LUZERNE	156
3.3.	CROISSANCE DES PLANTES ET ABSORPTION MINERALE	158
3.4.	DEVENIR DES POLLUANTS A L'ISSUE DE LA CULTURE DE LA LUZERNE	159
<b>CONCLUSION</b>		<b>161</b>

**PARTIE III Chapitre IV: DYNAMIQUE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DANS LE SOL TRAITE PAR DESORPTION THERMIQUE *IN SITU***

<b>INTRODUCTION</b>		<b>163</b>
<b>1.</b>	<b>STRUCTURE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET QUANTIFICATION DES BACTERIES DEGRADANTES DANS LE SOL DE NEUVES-MAISONS AU COURS DU TEMPS APRES LE TRAITEMENT PAR DESORPTION THERMIQUE</b>	<b>163</b>
1.1.	CONDUITE DE L'EXPERIENCE	163
1.2.	RESULTATS	164
1.2.1.	<i>Dénombrements des bactéries cultivables totales et dégradant les HAP</i>	164
1.2.2.	<i>Quantification des gènes 16S et des gènes de dégradation des HAP</i>	166
1.2.3.	<i>Analyse de la structure des communautés bactériennes</i>	169
<b>2.</b>	<b>STRUCTURE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET QUANTIFICATION DES BACTERIES DEGRADANTES POUR LE SOL DE NEUVES-MAISONS <i>IN SITU</i></b>	<b>172</b>
2.1.	CONDUITE DE L'EXPERIENCE	172
2.2.	RESULTATS	173
2.2.1.	<i>Quantification des gènes 16S et des gènes de dégradation des HAP</i>	173
2.2.2.	<i>Analyse de la structure des communautés bactériennes</i>	176
<b>3.</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>176</b>

## Table des matières

3.1. DIVERSITE ET RICHESSE BACTERIENNE DANS LE SOL DE NEUVES-MAISONS TRAITÉ PAR DESORPTION THERMIQUE.....	176
3.1.1. Prélèvements initiaux.....	176
3.1.2. Richesse bactérienne.....	177
3.1.3. Diversité bactérienne.....	178
3.1.4. Limites des méthodes utilisées.....	180
3.2. SOL DE NEUVES-MAISONS NON TRAITÉ ET TRAITÉ PAR DESORPTION THERMIQUE EN PARCELLES LYSIMETRIQUES.....	182
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>183</b>
 <b>PARTIE IV DISCUSSION GENERALE</b>	
<b>1. EFFET DES SOLS CONTAMINES ET TRAITES (BIOPILE ET DESORPTION THERMIQUE) SUR LES PLANTES ET LES MICROORGANISMES ASSOCIES.....</b>	<b>185</b>
1.1. IMPACT SUR LA CROISSANCE DES PLANTES.....	185
1.2. INFLUENCE SUR LE CHAMPIGNON MA.....	186
1.3. IMPACT SUR LES BACTERIES DEGRADANTES.....	187
<b>2. EFFET DES PLANTES ET DES MICROORGANISMES ASSOCIES SUR LE DEVENIR DES POLLUANTS DANS LES SOLS CONTAMINES ET TRAITES (BIOPILE ET DESORPTION THERMIQUE).....</b>	<b>188</b>
<b>3. LIMITES DE L'ETUDE ET APPROCHES COMPLEMENTAIRES.....</b>	<b>193</b>
3.1. LIMITES DE L'ETUDE.....	193
3.2. APPROCHES COMPLEMENTAIRES DE L'ETUDE.....	195
 <b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	 <b>197</b>
 <b>ANNEXES.....</b>	 <b>199</b>
 <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	 <b>205</b>

## LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

### Partie I : Synthèse bibliographique

<b>Tableau 1</b> : Propriétés physico-chimiques et toxicité de 16 HAP à 25°C .....	7
<b>Tableau 2</b> : Sources d'émission des HAP en France en 2000 .....	9
<b>Tableau 3</b> : Teneurs en HAP dans certains sols contaminés en fonction du type d'industrie .....	12
<b>Tableau 4</b> : Exemples VCI pour les ETM .....	16
<b>Tableau 5</b> : Exemples de valeurs guides étrangères et VCI françaises pour les HAP .....	17
<b>Tableau 6</b> : Activités industrielles sources de pollutions .....	18
<b>Tableau 7</b> : Procédés de fabrication et pollutions engendrées par la production du fer et de l'acier .....	20
<b>Tableau 8</b> : Traitements applicables aux sous-produits d'anciennes usines à gaz .....	47
<b>Tableau 9</b> : Différents traitements de remédiation physico-chimique de sols contaminés .....	48
<b>Tableau 10</b> : Différentes techniques de traitement biologique des sols contaminés .....	49
<b>Figure 1</b> : Schéma de fabrication du fer et de l'acier .....	19
<b>Figure 2</b> : Différentes voies de dégradation des HAP .....	24
<b>Figure 3</b> : Oxydation initiale du naphthalène en cis-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphtalène par la naphthalène-1,2-dioxygénase .....	26
<b>Figure 4</b> : Voie de dégradation du naphthalène par <i>Pseudomonas</i> sp ; NCIB 9816-4, G7 .....	27
<b>Figure 5</b> : Schéma simplifié des voies de dégradation du benzo[a]pyrène par les bactéries .....	28
<b>Figure 6</b> : Arbre phylogénétique construit à partir d'alignement des sous unités $\alpha$ de la dioxygénase .....	29
<b>Figure 7</b> : (a) Schéma des produits de transformation du benzo[a]pyrène par les champignons (b) Benzo[a]pyrène-quinones produites par l'oxydation du benzo[a]pyrène par les champignons .....	31
<b>Figure 8</b> : Arbre phylogénétique des champignons MA (Glomales) .....	38

### Partie II : Matériels et méthodes

<b>Tableau 11</b> : Caractéristiques agronomiques, physico-chimiques et teneurs en polluants des sols des anciens sites industriels étudiés .....	58
<b>Tableau 12</b> : Composition de la solution nutritive apportée aux cultures .....	63
<b>Tableau 13</b> : Description des amorces utilisées pour l'amplification de l'ensemble des champignons .....	74
<b>Tableau 14</b> : Description des amorces utilisées pour l'amplification des champignons mycorhiziens .....	75
<b>Tableau 15</b> : Description des amorces utilisées pour l'amplification des bactéries .....	75
<b>Tableau 16</b> : Composition du milieu réactionnel utilisé pour les PCR de l'ensemble des champignons et des champignons mycorhiziens .....	76
<b>Tableau 17</b> : Conditions de PCR pour amplifier (a) l'ensemble des champignons et (b) les champignons mycorhiziens à arbuscules .....	77
<b>Tableau 18</b> : Conditions de PCR pour amplifier les bactéries .....	77
<b>Tableau 19</b> : Composition du milieu réactionnel utilisé pour les PCR des bactéries .....	78
<b>Tableau 20</b> : Composition du gel utilisé en TTGE pour séparer les fragments d'ADN fongique et bactérien .....	79

<b>Tableau 21:</b> Conditions de migration des fragments d'ADN par TTGE .....	79
<b>Tableau 22 :</b> Description des amorces utilisées pour la quantification par PCR en temps réel .....	82
<b>Tableau 23 :</b> Composition du milieu réactionnel utilisé pour les PCR en temps réel .....	82
<b>Tableau 24 :</b> Conditions de quantification de l'ADN par PCR en temps réel .....	82
<b>Figure 9:</b> Localisation des sites d'Homécourt et de Neuves-Maisons .....	54
<b>Figure 10:</b> Principe de la désorption thermique .....	55
<b>Figure 11 :</b> Principe de la biopile .....	55
<b>Figure 12 :</b> Schéma de la répartition des différentes modalités dans le dispositif lysimétrique expérimental <i>in situ</i> .....	60
<b>Figure 13 :</b> schéma des analyses effectuées à l'issu des cultures .....	65
<b>Figure 14 :</b> Répartition en classes de la colonisation du cortex racinaire par le champignon mycorhizien et de la présence d'arbuscules .....	67
<b>Figure 15 :</b> Représentation schématique des étapes d'analyses moléculaires dans le sol et les racines pour les différents microorganismes (champignons et bactéries) .....	72
<b>Figure 16 :</b> Protocoles d'extraction de l'ADN à partir du sol adaptés aux sols étudiés .....	73
<b>Figure 17 :</b> Représentation schématique de la localisation des amorces permettant l'amplification de l'ensemble des champignons par PCR nichée .....	74
<b>Figure 18 :</b> Représentation schématique de la localisation des amorces permettant l'amplification des champignons mycorhiziens par PCR nichée .....	75
<b>Figure 19 :</b> Représentation schématique de la localisation des amorces permettant l'amplification par PCR des bactéries .....	76
 <b>Partie III : Résultats et discussions</b>	
<b>Chapitre I : Caractérisation de la pollution et des propriétés biologiques des cinq sols étudiés</b>	
<b>Tableau 25 :</b> Taux de germination des graines de luzernes désinfectées dans le sol initial d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique et dans le sol initial de Neuves-maisons non traité et traité par désorption thermique .....	94
<b>Tableau 26 :</b> Dénombrement bactérien dans le sol initial d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique et dans le sol initial de Neuves-maisons non traité et traité par désorption thermique .....	95
<b>Figure 20:</b> Répartition des HAP dans le sol initial d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique et dans le sol initial de Neuves-maisons non traité et traité par désorption thermique .....	89
<b>Figure 21 :</b> Teneurs en cadmium, chrome, mercure et plomb total dans les le sol initial d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique et dans le sol initial de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique .....	92
<b>Figure 22 :</b> Teneurs en zinc total et extractible à l'EDTA dans le sol initial d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique et dans le sol initial de Neuves-maisons	

non traité et traité par désorption thermique.....	93
<b>Figure 23 :</b> Nombre de copies de gène 16S, de gène NDO pour les bactéries Gram + (GP1) et les bactéries Gram – (GN3) obtenues par technique de PCR en temps réel sur le sol initial d’Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique et dans le sol initial de Neuves-maisons non traité et traité par désorption thermique.....	97
<b>Figure 24 :</b> Rapport entre le nombre de copies gène de NDO pour les bactéries Gram + (GP1) et Gram – (GN3) et le nombre de copies de gène 16S obtenues par technique de PCR en temps réel sur le sol initial d’Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique et dans le sol initial de Neuves-maisons non traité et traité par désorption thermique.....	98
<b>Chapitre II : Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d’Homécourt</b>	
<b>Tableau 27:</b> Survie des plantes après 56 jours de culture de la luzerne sur le sol d’Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.....	104
<b>Tableau 28 :</b> Teneurs en éléments majeurs (Fe, Mg, Ca et K) dans les parties aériennes et les racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d’Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.....	110
<b>Tableau 29:</b> Paramètres de mycorhization et nombre de nodosités dans les racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d’Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.....	112
<b>Tableau 30 :</b> Indices de diversité des communautés bactériennes et nombre de bandes moyen obtenu par TTGE dans le sol rhizosphérique de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d’Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.....	117
<b>Tableau 31 :</b> Indices de diversité des communautés fongiques et nombre de bandes moyen obtenu par TTGE dans le sol rhizosphérique de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d’Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.....	120
<b>Figure 25 :</b> Photographie du dispositif après 56 jours de culture.....	105
<b>Figure 26 :</b> Biomasse des parties aériennes et des racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d’Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.....	107
<b>Figure 27 :</b> Teneur en phosphore des parties aériennes et des racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d’Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.....	108
<b>Figure 28 :</b> Gel de TTGE montrant les différents profils obtenus par les techniques de PCR-TTGE sur l’ADN 18S dans les racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d’Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.....	114
<b>Figure 29 :</b> Arbre phylogénétique basé sur des alignements des séquences de l’ADNr 18S pour les champignons mycorhiziens présents dans les racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d’Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.....	115
<b>Figure 30 :</b> Analyse en composante principale (ACP) des profils des communautés bactériennes obtenus par TTGE dans le sol rhizosphérique de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d’Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.....	117

<b>Figure 31</b> : ACP des profils des communautés bactériennes obtenus par TTGE dans le sol rhizosphérique et le sol non rhizosphérique de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d’Homécourt traité par biopile.....	118
<b>Figure 32</b> : ACP des profils des communautés fongiques obtenus par TTGE dans le sol rhizosphérique de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d’Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.....	120
<b>Figure 33</b> : Teneur de l’ensemble des HAP dans le sol rhizosphérique et non rhizosphérique de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d’Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.....	122
<b>Figure 34</b> : Répartition de l’ensemble des HAP dans le sol rhizosphérique et non rhizosphérique de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d’Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.....	123
<b>Figure 35</b> : Teneur en zinc dans les parties aériennes et les racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d’Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.....	125
 <b>Chapitre III : Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site de Neuves Maisons</b>	
<b>Tableau 32</b> : Paramètres de mycorhization et nombre de nodosités dans les racines de la luzerne après 37 jours sur le sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique.....	148
<b>Tableau 33</b> : Dénombrement bactérien dans les sols plantés et non plantés après 37 jours sur le sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique.....	149
<b>Figure 36</b> : Photographie du dispositif après 37 jours de culture.....	140
<b>Figure 37</b> : Biomasse dans les parties aériennes et les racines de luzerne après 37 jours de culture sur le sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique.....	142
<b>Figure 38</b> : Mesures du pH du sol planté et non planté après 37 jours de culture de la luzerne sur le sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique.....	143
<b>Figure 39</b> : Teneur en phosphore dans les parties aériennes et les racines de luzerne après 37 jours sur le sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique.....	144
<b>Figure 40</b> : Teneurs en potassium, magnésium, calcium et fer dans les parties aériennes de luzerne après 37 jours sur le sol de Neuves-maisons non traité et traité par désorption thermique.....	146
<b>Figure 41</b> : Teneur de l’ensemble des HAP dans le sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique, planté et non planté après 37 jours de culture.....	151
<b>Figure 42</b> : Répartition de l’ensemble des HAP dans le sol de Neuves-Maisons planté et non planté après 37 jours de culture.....	152
<b>Figure 43</b> : Teneurs en éléments en traces (plomb, zinc, cuivre) et métalloïde (arsenic) dans les parties aériennes de luzerne après 37 jours de culture sur le sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique.....	153

**Chapitre IV : Dynamique des communautés microbiennes dans le sol de Neuves Maisons traités par désorption thermique *in situ***

## Liste des tableaux et des figures

<b>Figure 44 :</b> Nombre de bactéries cultivables et dégradant les HAP dans le sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique prélevé <i>in situ</i> au cours du temps et pourcentage de bactéries dégradant les HAP par rapport aux bactéries totales.....	165
<b>Figure 45 :</b> Nombre de copies de gène 16S et gène de naphtalène dioxygénase (NDO) pour les bactéries Gram + (GP1) et les bactéries Gram – (GN3) obtenus par technique de PCR en temps réel pour le sol de Neuves-Maisons traité prélevé <i>in situ</i> au cours du temps après traitement par désorption thermique.....	167
<b>Figure 46:</b> Rapports entre le nombre de copies de gène de naphtalène dioxygénase (NDO) pour les bactéries Gram + (GP1) et Gram – (GN3) et le nombre de copies de gène bactérien total 16S obtenus par technique de PCR en temps réel pour le sol de Neuves-Maisons traité prélevé <i>in situ</i> au cours du temps après traitement par désorption thermique.....	168
<b>Figure 47 :</b> Gel de TTGE montrant les différents profils obtenus par les techniques de PCR-TTGE sur l'ADNr 16S dans le sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique prélevé <i>in situ</i> au cours du temps.....	169
<b>Figure 48 :</b> Arbre phylogénétique basé sur l'alignement des séquences de l'ADNr 16S pour les bactéries présentes dans le sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique prélevé <i>in situ</i> au cours du temps.....	171
<b>Figure 49 :</b> Analyse par ACP des profils des communautés bactériennes obtenus par TTGE dans le sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique prélevé <i>in situ</i> au cours du temps.....	172
<b>Figure 50 :</b> Nombre de copies de gène 16S, de gène NDO pour les bactéries Gram + (GP1) et les bactéries Gram – (GN3) obtenues par technique de PCR en temps réel sur le sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique prélevé à $t_0$ sur les parcelles lysimétriques.....	174
<b>Figure 51 :</b> Rapport entre le nombre de copies gène de NDO pour les bactéries Gram + (GP1) et Gram – (GN3) et le nombre de copies de gène 16S obtenues par technique de PCR en temps réel sur le sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique prélevé à $t_0$ sur les parcelles.....	175
<b>Figure 52 :</b> Gels de TTGE montrant les différents profils obtenus par les techniques de PCR-TTGE sur l'ADN 16S dans les parcelles de sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique prélevé à $t_0$ .....	176
 <b>Annexes</b>	
<b>Tableau A1:</b> Teneurs en éléments majeurs (Fe, Mg, Ca et K) dans les parties aériennes et les racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.....	199
<b>Figure A2.1.:</b> Gel de TTGE montrant les différents profils obtenus par les techniques de PCR-TTGE sur l'ADN 18S dans les racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt non traité.....	201
<b>Figure A2.2. :</b> Gel de TTGE montrant les différents profils obtenus par les techniques de PCR-TTGE sur l'ADN 18S dans les racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt traité par biopile.....	202

**Figure A2.3:** Gel de TTGE montrant les différents profils obtenus par les techniques de PCR-TTGE sur l'ADN 18S dans les racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt traité par désorption thermique.....203

## **LISTE DES ABBREVIATIONS**

- ACP** : Analyse en Composantes Principales
- ADEME** : Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
- ADN** : Acide DesoxyriboNucleique
- ADNr** : Acide DesoxyriboNucleique ribosomique
- AFNOR** : Association Française de NORmalisation
- AISI** : American Iron and Steel Insitute
- APS** : Ammonium PerSulfate
- ARN** : Acide RiboNucleique
- ASE** : Accelerated Solvent Extraction, extraction accélérée par solvant
- BET** : Bromure d'Ethidium
- BH** : Bushnell-Haas
- BLAST** : Basic Local Alignment Search Tool
- Bp** : Base Pair
- BSA** : Sérum d'Albumine Bovine
- CT** : Cycle Threshold
- CTAB** : CetylTrimethylAmmonium Bromide
- DMSO** : DiMethylSulfOxide
- dNTP** : DesoxyNucleoside TriPhosphate
- DO<sub>x</sub>** : Densité Optique (à la longueur d'onde x)
- DRIRE** : Direction Régionale de l'Industrie, de la Recherche et de l'Environnement
- EDTA** : : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
- EPA** : Environmental Protection Agency
- ESE** : Laboratoire d'Ecotoxicité et Santé Environnementale
- ETM** : Eléments en Traces Métalliques
- G2R**: Laboratoire Géologie et Gestion des Ressources minérales et énergétiques
- GC-FID**: Gas Chromatography with Flame Ionization Detector
- GISFI** : Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles
- HAP** : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
- IARC** : International Agency for Research on Cancer
- ICP-AES**: Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry
- IGS** : InterGenic Spacer
- ITS** : Internal Transcribed Spacer

**LIMOS** : Laboratoire des **I**nteractions **M**icroorganismes **M**inéraux **M**atière **O**rganique dans les **S**ols

**LSE** : Laboratoire **S**ols et **E**nvironnement

**LSGC** : Laboratoire des **S**ciences du **G**énie **C**himique

**MARS**: **M**icrowave **A**ccelerated **R**eaction **S**ystem

**MO** : Matière **O**rganique

**MOD** : Matière **O**rganique **D**issoute

**NB** : Nutrient **B**oth

**NDO** : Naphtalène **D**i**O**xgénase

**NF ISO** : Norme **F**rançaise **I**nternational **O**rganization for **S**tandardization

**NPP** : Nombre le **P**lus **P**robable

**PAH-RHD $\alpha$**  : **P**olycyclic **A**romatic **H**ydrocarbon - **R**ing **H**ydroxylating **D**ioxygenase  $\alpha$

**PCB** : Poly**C**hloro-**B**yphényles

**PCR** : **P**olymerase **C**hain **R**eaction

**pH** : Potentiel **H**ydrogène

**PVPP**: Polyvinyl**p**olypyrrolidone

**SDS**: Sodium **D**odecyl **S**ulphate

**TAE** : Tris base 2 M, Acide acétique glacial 1 M, **E**DTA pH = 8,50 mM

**Taq polymerase** : *Thermophilus aquaticus* polymerase

**TEMED** : N, N, N, N, **T**Etra**M**ethyl**E**thylene**D**iamine

**Tm** : Température de dénaturation

**TTGE** : Temporal **T**emperature **G**radient **E**lectrophoresis

**UV** : Ultra **V**iolet

**VCI** : Valeurs de **C**onstat d'**I**mpact

**VOC** : Volatil **O**rganic **C**ompound

# Introduction générale



## **INTRODUCTION GENERALE**

### **CONTEXTE DE L'ETUDE**

Depuis toujours l'homme agit plus ou moins directement sur l'environnement. Cette action a pris plus d'ampleur au cours des siècles derniers avec l'apogée de l'industrie et les progrès dans les sciences et techniques qu'elles soient industrielles, agricoles ou domestiques.

Ainsi, pendant de nombreuses années, les activités humaines ont contribué à dégrader les écosystèmes en rejetant des quantités croissantes de substances polluantes ou de déchets. Le déclin industriel a mis au jour de nombreux sites pollués par une activité passée. En France 3735 sites industriels pollués sont recensés (BASOL, 2004), dont 16 % sont contaminés par les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP). En région Lorraine (Nord-Est de la France) plus de 6 000 ha de friches industrielles (1995), soit près de 285 sites pollués, ont été répertoriés (DRIRE, 2003).

Cette pollution active ou inactive présente des risques pour la santé humaine par l'exposition directe avec les polluants ou indirecte via l'eau, l'air, les sédiments et le sol. La prise de conscience de ces risques conduit à la nécessité d'établir des diagnostics de la pollution et de mettre en œuvre des moyens pour y remédier. De nombreux sols contaminés présentent une contamination multiple, à la fois organique et métallique, ce qui rend plus complexe encore le diagnostic et le traitement de la contamination.

Les techniques de remédiation des sols sont nombreuses et reposent sur des processus physico-chimiques ou biologiques. La remédiation des sols contaminés en Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) peut ainsi être réalisée par des techniques visant à optimiser le potentiel biologique naturel de dégradation des hydrocarbures (par exemple, par biopile) ou par des techniques se basant sur la volatilisation des HAP à hautes températures (par exemple, la désorption thermique). La réduction de la teneur en HAP contenue dans les sols par ces techniques est rapide (quelques heures à quelques mois), cependant, malgré une réduction importante du niveau de contamination en HAP, une concentration résiduelle en hydrocarbures demeure dans les sols traités. Du reste, il est important de noter que les traitements des sols par de telles techniques ne concernent que les polluants potentiellement volatiles (HAP, mercure, etc.) mais n'ont que peu d'impact sur les autres contaminants (Eléments en Traces Métalliques ou ETM, métalloïdes, etc.). Enfin, l'impact des traitements

de remédiation sur les qualités physico-chimiques et biologiques des sols, et éventuellement la nécessité de les restaurer, sont rarement pris en compte.

La remédiation de sols contaminés en HAP peut également être réalisée par phytoremédiation. Cette technique utilise les plantes et les microorganismes associés pour dégrader les polluants, en particulier les HAP. Elle a été proposée comme une méthode alternative et écologique pour traiter de larges surfaces de sols contaminées, ou en complément d'un autre traitement. Cependant, son utilisation est encore surtout limitée au stade expérimental ou de démonstration. Les travaux effectués au LIMOS précédemment (Joner *et al*, 2001 ; Joner et Leyval, 2003a) ont montré le rôle potentiel des champignons mycorhiziens à arbuscules vis-à-vis de la biodégradation des HAP. Ainsi, ces champignons qui favorisent la croissance des plantes en conditions de stress, ce qui est le cas dans les sols pollués, contribuent à augmenter la dissipation des HAP dans la rhizosphère, et réduisent la toxicité des ETM vis-à-vis des plantes. Comme pour les plantes, l'effet des champignons mycorhiziens sur la biodégradation serait dû, au moins en partie, à un effet indirect via les communautés microbiennes de la rhizosphère. Ainsi l'utilisation des plantes en symbiose avec un champignon mycorhizien dans des sols contaminés avant et après leurs traitements peut contribuer à (i) réduire la contamination présente dans les sols contaminés et (ii) améliorer ou restaurer les propriétés biologiques de ces sols.

Dans ce contexte, le présent travail vise à évaluer (i) l'influence de la rhizosphère de la luzerne (*Medicago sativa* L.) et de l'association avec un champignon mycorhizien à arbuscules (*Glomus intraradices*), fertilisés ou non sur le devenir des polluants dans des sols à pollution multiple (HAP, métaux) avant et après traitement par biopile et par désorption thermique (ii) mesurer l'effet des sols contaminés et traités sur les plantes et la microflore rhizosphérique.

Pour tenter de répondre à ces différentes questions, le présent travail se subdivise en quatre parties :

- (i) la première partie est une synthèse des différents travaux de la littérature scientifique où sont exposées les données relatives aux HAP, à leur devenir dans l'environnement et dans la rhizosphère,

(ii) la deuxième partie expose les différents matériels et méthodes utilisés au cours de ce travail. Les travaux ont porté sur des sols contaminés et traités par biopile et par désorption thermique, issus de deux sites industriels contaminés. Des expériences de cultures de plante mycorhizées ou non ont été effectuées au laboratoire ainsi que des prélèvements de sols *in situ* au cours du temps,

(iii) la troisième partie expose les résultats obtenus. Elle comporte quatre chapitres consacrés (a) à la caractérisation de la pollution et des propriétés biologiques des cinq sols étudiés, (b) au devenir des HAP et des communautés microbiennes dans la rhizosphère avec des sols contaminés avant et après traitement de remédiation pour chacun des deux sites étudiés et (c) à la caractérisation de la microflore bactérienne d'un sol traité par désorption thermique *in situ*, et à son suivi au cours du temps,

(iv) la quatrième et dernière partie discute les principales observations faites au cours de ce travail et ouvre des perspectives pour le poursuivre.

Ce travail a été réalisé dans le cadre du GISFI (Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles), dont les objectifs sont l'étude et la gestion des sols de friches industrielles contaminés, et de la plate-forme *in situ* qu'il gère.



# PARTIE I

---

## Synthèse bibliographique



Cette partie a pour but (i) de présenter de façon générale les HAP, (ii) de montrer leur devenir dans l'environnement et (iii) dans la rhizosphère via les organismes vivants (plantes, bactéries et champignons mycorhiziens à arbuscules) pour enfin (iv) lister les moyens de réhabilitation des sites contaminés par les HAP.

## **1. LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES-GENERALITES**

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) constituent une classe importante de polluants issus de l'activité industrielle. Ce sont des molécules ubiquistes, persistantes et toxiques que l'on peut trouver dans l'ensemble des écosystèmes. Cette première partie présente de façon générale (i) la nature, les propriétés physico-chimiques et la toxicité de ces composés, (ii) leur distribution au sein des différents compartiments de l'environnement et enfin (iii) l'activité industrielle à l'origine de leur production.

### **1.1. DEFINITION – CLASSIFICATION**

Les HAP sont des composés aromatiques hétérocycliques constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène. Ces molécules organiques possèdent au moins deux cycles benzéniques (Menzie *et al.*, 1992; Li et Chen, 2002). Il existe des composés apparentés aux HAP dont certains atomes de carbone sont substitués par des atomes d'azote, de soufre ou d'oxygène (Wilson et Jones, 1993).

La Communauté Européenne et les Etats-Unis (via l'Environmental Protection Agency, EPA) ont classés comme polluants prioritaires 16 HAP formés de 2 à 6 cycles (Keith et Teilliard, 1979) (tableau 1), même si plus de cent HAP différents sont aujourd'hui répertoriés. En effet, le nombre de noyaux accolés est sans limite et le nombre d'isomères augmente avec le nombre de cycles aromatiques.

Les HAP sont classés en deux groupes selon le nombre de cycles benzéniques qui les compose et l'état de condensation de ces noyaux de type phénol: les HAP légers (2 à 3 cycles), de masse molaire comprise entre 150 et 180 g.mol<sup>-1</sup> et les HAP lourds (4 cycles ou plus), de masse molaire supérieure à 200 et 280 g.mol<sup>-1</sup>.

A l'état pur, les HAP se trouvent sous forme solide, sont souvent colorés et cristallins à température ambiante. Ce sont des composés neutres et non polaires dont le point de fusion est supérieur à 100°C et le point d'ébullition à 300°C.

## 1.2. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES HAP

Les propriétés physico-chimiques des HAP varient selon la masse moléculaire, le nombre et l'assemblage des cycles qui composent la molécule. Le devenir et la mobilité des HAP dans l'environnement sont principalement contrôlés par leur faible solubilité, leur hydrophobicité et leur pression de vapeur saturante.

### ■ Solubilité

La solubilité correspond à la concentration du produit en phase aqueuse à l'équilibre et elle augmente avec la température. La plupart des HAP sont pratiquement insolubles dans l'eau (Edwards, 1983), leur solubilité étant inversement proportionnelle au nombre de cycles de la molécule (taille et angularité) (Haesseler, 1998) (tableau 1). Leur solubilité en phase aqueuse est modérée à très faible et diminue lorsque le poids moléculaire de la molécule augmente : de 30 mg.L<sup>-1</sup> pour les HAP légers à 2,6 10<sup>-4</sup> mg.L<sup>-1</sup> pour les lourds.

### ■ Coefficient de partage octanol/eau

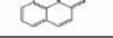
Le coefficient de partage octanol/eau (log K<sub>ow</sub>) traduit la répartition d'une molécule de soluté entre la phase lipophile (octanol) et la phase hydrophile (eau). Il évalue l'hydrophobicité d'une molécule et son potentiel lipophile. Il permet de connaître la capacité de la molécule organique (Fu *et al.*, 1994) à s'accumuler dans les êtres vivants au niveau des tissus adipeux et des membranes phospholipidiques. Par sa détermination, il est possible d'estimer l'adsorption du composé au niveau des régions hydrophobes du sol (matière organique, cires, lipides, matières particulaires) (Weissenfels *et al.*, 1992 ; Marschner, 1999) qui se fait via des liaisons hydrophobes plus ou moins stables, lui permettant de persister dans l'environnement (Bouwer et Zehnder, 1993 ; Hartmann, 1996 ; Van Brummelen *et al.*, 1996).

Les log K<sub>ow</sub> des HAP sont relativement élevés, variant de 3,37 à 6,5 (Mackay *et al.*, 1992), selon le nombre de noyaux aromatiques du composé (tableau 1), et indiquent ainsi la nécessité d'utiliser des solvants organiques ou des tensioactifs pour leur extraction.

### ■ Pression de vapeur

La pression ou tension de vapeur permet de connaître la capacité d'un produit à passer d'une phase gazeuse à une phase aqueuse. A partir de 10<sup>-5</sup> kPa, les composés sont considérés comme volatils. Les tensions de vapeur des HAP de 2 à 3 cycles indiquent que ces molécules sont volatiles, enrichissant ainsi relativement le milieu en HAP de fort poids moléculaire (tableau 1).

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques et toxicité de 16 HAP à 25°C.

Composé	Formule semi développée <sup>a</sup>	Nombre de cycle <sup>a</sup>	Formule brute <sup>a</sup>	Masse molaire <sup>a</sup> (g.mol <sup>-1</sup> )	Solubilité dans l'eau <sup>a</sup> 25°C Sw (mg.L <sup>-1</sup> )	Coefficient de partage octanol/eau <sup>a</sup> log Kow	Pression de vapeur saturante <sup>a</sup> (Pa)	Temps de demi vie <sup>b</sup> (j;jours, a;ans)	Toxicité <sup>c</sup>
naphthalène		2	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	128,2	31	3,4	36,8	16 j-48 j	non étudié
acénaphthylène		3	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>	152,2	16,1	4,0	4,14	non étudié	non étudié
acénaphthène		3	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>	154,2	3,8	3,9	1,52	non étudié	non étudié
fluorène		3	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	166,2	1,9	4,2	0,715	32 j-60 j	3
phénanthrène		3	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178,2	1,1	4,6	0,113	16 j-200 j	3
anthracène		3	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178,2	0,05	4,5	0,0778	50 j-1,3 a	3
fluoranthène		4	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202,3	0,26	5,2	8,72.10 <sup>-3</sup>	140 j-1,2 a	3
pyrène		4	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202,3	0,13	5,2	0,0119	210 j-5,2 a	3
benzo[a]anthracène		4	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228,3	0,01	5,9	6,06.10 <sup>-4</sup>	102 j-1,9 a	2A
chrysène		4	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228,3	0,002	5,6	8,4.10 <sup>-7</sup>	1 a-2,7 a	3
benzo[b]fluoranthène		5	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252,3	0,002	5,8	6,7.10 <sup>-5</sup>	non étudié	2B
benzo[k]fluoranthène		5	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252,3	0,001	6,0	4,12.10 <sup>-6</sup>	2,5 a-5,9 a	2B
benzo[a]pyrène		5	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252,3	0,004	6,0	2,13.10 <sup>-5</sup>	non étudié	2A
dibenzo[a,h]anthracène		5	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	278,4	0,0006	6,8	9,16.10 <sup>-8</sup>	361 j-2,6 a	non étudié
indénol[1,2,3-c,d]pyrène		6	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	276,3	0,062	6,6	1,3.10 <sup>-8</sup>	1,6 a-2 a	2B
dibenzo[g,h,i]pérylène		6	C <sub>21</sub> H <sub>16</sub>	268,4	0,0003	6,5	2,25.10 <sup>-5</sup>	0,25 a-1,8 a	3

<sup>a</sup> : Mackay *et al.*, 1992 ; <sup>b</sup> : IARC, 1997, 2000)

**Toxicité** : 2A = composé probablement cancérigène pour l'homme ; 2B = composé pouvant être cancérigène pour l'homme ; 3 = composé inclassable quant à son effet cancérigène pour l'homme (effet possible mais pas assez étudié).

### 1.3. ORIGINE DES HAP

Les HAP ont pour origine différents processus : la combustion incomplète de la matière organique, la diagenèse et la biogenèse. Les sources naturelles d'émission de HAP dans l'environnement sont les feux de forêt, les éruptions volcaniques, mais aussi les réactions biogènes générées par les plantes et les microorganismes (formation de l'humus et minéralisation de la matière organique) (Henner *et al.*, 1997 ; Juhasz et Naïdu, 2000 ; Wilcke, 2000), ainsi que les réactions géologiques associées à la formation de fuel fossile (Wilson et Jones, 1993). On trouve, par exemple, de 1 à 10 µg.Kg<sup>-1</sup> de HAP dans les sols à la suite d'éruptions volcaniques et de feux de forêt (Edwards, 1983). Ces sources naturelles restent

diffuses, d'origines anciennes et peu conséquentes, à l'inverse des sources anthropiques plus importantes et plus dommageables pour l'environnement. Les précipitations et les dépôts atmosphériques (Kim *et al.*, 2003) sont à l'origine du transport des HAP dans l'environnement.

La plus importante source de HAP d'origine anthropique est l'activité industrielle par la combustion incomplète des combustibles fossiles (Wild et Jones, 1995, Vierle *et al.*, 1999, Samanta *et al.*, 2002 ; Venkataraman *et al.*, 2002). Les mécanismes mis en jeu lors de leur formation font intervenir la production de radicaux libres par pyrolyse à haute température ( $\geq 500^{\circ}\text{C}$ ) de la matière fossile (pétroles, fuel, matières organiques...) dans des conditions déficientes en oxygène. L'émission de HAP se produit notamment lors de l'extraction et du raffinage du pétrole (Hill et Goshal, 2002), de l'aluminerie, de la sidérurgie, de la cokéfaction (Menzie *et al.*, 1992 ; Arzayus *et al.*, 2001 ; Hill et Goshal 2002) et lors du stockage d'hydrocarbures de goudron de bitume (Colin, 2000). Cependant, les contaminations de l'environnement en HAP peuvent provenir de nombreuses autres sources liées à l'activité humaine : l'activité quotidienne (chauffage au fuel), les usines d'incinération des déchets, le transport routier par émission de gaz d'échappement (Edwards, 1983 ; Wilson et Jones, 1993 ; Wild et Jones, 1995 ; Tremolada *et al.*, 1996 ; Krein et Shorer, 2000 ; Tuchackova *et al.*, 2001), l'utilisation de produits à base de créosote pour la conservation du bois et le transport ferroviaire (la créosote peut contenir 85 % de HAP). L'importance relative des différentes sources de HAP est variable. Ainsi en France, en 2000, le chauffage domestique et le transport représentaient la part la plus importante des sources d'émission de HAP (tableau 2).

Le processus de formation des différents HAP varie selon l'origine des molécules. On peut alors calculer les rapports de concentration en différents HAP (indices moléculaires) pour préciser leur origine. Ainsi, si le rapport de la concentration en anthracène sur celle du phénanthrène est supérieur à 10, leur origine est pétrogénique et s'il est inférieur à 10, elle est d'origine pyrolytique.

#### 1.4. TOXICITE DES HAP

Les HAP ont un fort pouvoir cancérigène, mutagène et ont, par conséquent, des effets nocifs pour la santé humaine. L'exposition humaine aux HAP peut se faire via l'alimentation (les HAP se forment durant la cuisson ou s'accumulent dans les aliments par voie atmosphérique), par voie pulmonaire ou par voie cutanée (Nielsen *et al.*, 1996). Une partie des HAP inhalés pénètre dans l'organisme par l'intermédiaire des cellules de l'épithélium bronchique ou des cellules alvéolaires. Les HAP avalés sont rapidement absorbés au niveau intestinal et métabolisés au niveau du foie et les HAP absorbés par voie cutanée sont, en

quelques minutes, distribués à l'ensemble de l'organisme. L'International Agency for Research on Cancer (IARC) définit certains HAP comme étant probablement ou pouvant être cancérigènes pour l'homme (tableau 1). Certains HAP restent à ce jour encore insuffisamment étudiés pour permettre d'en évaluer la toxicité.

**Tableau 2 : Sources d'émission des HAP en France en 2000 (CITEPA, 2000).**

Activités	Quantités émises	
	%	tonnes
Chauffage domestique	46,0	147,2
Transport (énergie fossile)	21,4	68,5
Industrie:	17,6	56,3
Sidérurgie	15,0	48,0
Construction	1,5	4,8
Papier	1,1	3,5
Agriculture	8,5	27,2
Naturelles (incendies, volcanisme)	1,1	3,5
Autres	5,4	17,3
<b>Total</b>	<b>100 %</b>	<b>320 tonnes</b>

Chez l'homme, l'exposition chronique aux HAP conduit à un effet génotoxique de ces molécules. En effet, la métabolisation des HAP se réalise au niveau hépatique par oxydation par le cytochrome P-450 et l'époxyde hydrolase (Glatt *et al.*, 1993), selon deux voies d'initiation (via le diol-époxyde ou le bis-diol-époxyde). L'oxydation provoque ainsi la formation d'une molécule de type époxyde ou dihydrodiol puis d'une molécule de type époxyde-diol et enfin des tétrols. Ces molécules, plus réactives que les composés initiaux (Santodonato *et al.*, 1981), sont capables de se fixer à l'ADN sous forme d'adduits de façon covalente. Si l'ADN n'est pas réparé, cet adduit peut provoquer des mutations du gène et ainsi provoquer l'initiation d'un cancer.

La toxicité des HAP peut s'exprimer selon plusieurs paramètres : la molécule, le type d'exposition (aiguë ou chronique), les cellules et l'organisme touchés. On distingue une toxicité photo-induite (Arfsten *et al.*, 1996) et une toxicité induite par activation biochimique.

Cette toxicité est proportionnelle au nombre de cycles que possède la molécule. La génotoxicité est ainsi d'autant plus importante que la molécule a un fort poids moléculaire. Le degré de linéarité de la molécule est également un critère de son pouvoir mutagène et cancérigène : une molécule non linéaire sera moins stable et plus nocive du fait de l'hydrophobicité de certaines liaisons (Dabestani et Ivanov, 1999). La toxicité d'une molécule dépend également de sa pureté. En effet, une molécule à l'état pur est moins nocive que si elle

se trouve en mélange avec d'autres molécules avec qui elle peut entrer en synergie (Renoux *et al.*, 1999).

La métabolisation des HAP peut permettre leur élimination de l'organisme par les systèmes biliaires et urinaires en rendant les métabolites plus solubles que la molécule initiale. Cependant, ces métabolites peuvent s'avérer plus néfastes que la molécule initiale après l'activation métabolique (Gram, 1995).

L'effet phytotoxique des HAP a été observé à travers la diminution de la germination, des retards de croissance et de rendement (Chaineau *et al.*, 1996 ; Reilley *et al.*, 1996), l'apparition de chloroses, des diminutions de l'activité photosynthétique et des stress hydriques (Reilley *et al.*, 1996).

Cette forte toxicité des HAP vis-à-vis des organismes vivants est d'autant plus grave que l'on retrouve ces polluants dans l'ensemble de la biosphère.

## 1.5. DISTRIBUTION DES HAP

### ■ Eau

Par leur nature hydrophobe, les HAP contenus dans les milieux aquatiques sont principalement liés aux particules organiques et minérales en suspension dans l'eau (Herbes, 1977). Le dépôt de ces particules transfère la contamination en HAP vers les sédiments.

Les HAP peuvent s'accumuler dans les organismes marins selon la contamination de l'eau, des sédiments ou de la chaîne alimentaire, mais aussi selon la physiologie de l'organisme (Meador *et al.*, 1995). La taille de l'organisme, le taux d'ingestion, la perméabilité membranaire, le temps de résidence et l'osmorégulation affectent la contamination des organismes marins par les HAP (Juhasz et Naidu, 2000). La température, la teneur en oxygène, le pH et la salinité, quant à eux, influencent la biodisponibilité des HAP dans le milieu aquatique.

### ■ Atmosphère

L'atmosphère est le compartiment de l'écosystème où les rejets en HAP sont les plus importants ce qui constitue leur voie de contamination majoritaire. Wild et Jones (1995) estiment que les émissions de 11 HAP dans l'atmosphère britannique atteignent 700 t.a<sup>-1</sup> pour un taux de dépôt moyen de 8,4 g.ha<sup>-1</sup>.a<sup>-1</sup>. La taille des HAP, leur pression de vapeur, les conditions météorologiques (précipitations...) déterminent la localisation et l'état des molécules dans l'atmosphère (phase gazeuse ou phase particulaire) (Back *et al.*, 1991) et leur temps de résidence dans celle-ci. Les concentrations des HAP atmosphériques sont variables

selon le lieu concerné, de quelques dizaines de  $\text{pg.m}^{-3}$  de HAP en Antarctique à 2-300  $\text{ng.m}^{-3}$  de HAP en milieu urbain (Ramadahl *et al.*, 1982).

On remarque également une variabilité saisonnière marquée par des concentrations plus importantes en hiver (augmentation des émissions dues au chauffage domestique, moins de photodégradation, tendance des HAP à rester en phase particulaire à basses températures, limitation des phénomènes dispersifs) (Greenberg *et al.*, 1985 ; Halsall *et al.*, 1997 ; Motelay-Massei *et al.*, 2004). Cette variation saisonnière peut atteindre, pour le benzo [a] pyrène, 0,23  $\text{ng.m}^{-3}$  en été à 1,63  $\text{ng.m}^{-3}$  en hiver (Greenberg *et al.*, 1985).

#### ■ Sédiment

Bien que la majorité des HAP soit émise dans l'atmosphère, le sol et les sédiments constituent le principal point de fuite environnemental de ces polluants (Wilcke, 2000). Les HAP, molécules hydrophobes, se lient aux particules organiques des sédiments où ils s'accumulent (Meador *et al.*, 1995). Les sources des HAP sédimentaires marins sont atmosphériques, liées à l'industrie pétrolière en haute mer, au transport fluvial ou maritime, aux contaminations issues du littoral (Shiaris et Jambard-Sweet, 1986 ; Yunker *et al.*, 1993 ; Baumard *et al.*, 1998). La concentration des HAP dans les sédiments est variable (du  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  au  $\text{g.Kg}^{-1}$ ). Par exemple, Shiaris et Jambard-Sweet (1986) ont mesuré 718  $\text{mg.Kg}^{-1}$  de HAP dans les sédiments se trouvant à proximité du port de Boston. Cependant, la contamination en HAP des sédiments peut s'avérer être plus importante, puisque Johnson *et al.*, (1985) ont montré la présence de plus de 100  $\text{mg.g}^{-1}$  de HAP dans les sédiments d'estuaires urbanisés.

#### ■ Sol

C'est au cours du XIX<sup>ème</sup> siècle que les concentrations en HAP dans les sols industrialisés ont commencé à augmenter avec un maximum vers 1950-1960 (Juhasz et Naidu, 2000), constituant une source importante de pollution de ce compartiment de l'écosystème (Trapido, 1999 ; Motelay-Massei *et al.*, 2004). Jones *et al.* (1989) estiment qu'un sol sans contamination a des teneurs en HAP de l'ordre de 0,1 à 55  $\text{mg.Kg}^{-1}$ . Wild et Jones (1995) estiment que 90 % des HAP émis dans l'environnement sont stockés dans les sols, sans comptabiliser ceux des sites industriels. En effet, la contamination des sols à proximité des sites industriels est importante. Elle diminue de façon exponentielle en s'éloignant de la source émettrice (Crépineau *et al.*, 2003) et dépend du mode de transport et de la concentration en polluants. Les teneurs en HAP trouvés dans les sols dépendent également du type d'industrie (tableau 3). Juhasz et Naidu (2000) montrent que le stockage du bois représente la plus importante source de contamination en HAP apportant aux sols 18 700

mg.Kg<sup>-1</sup>, contre plus de 7 000 mg.Kg<sup>-1</sup> pour les usines à gaz. Les sols agricoles peuvent également être contaminés par les HAP via l'épandage des boues de stations d'épuration (Wild *et al*, 1992).

**Tableau 3 : Teneurs en HAP en mg.g<sup>-1</sup> sol dans certains sols contaminés en fonction du type d'industrie (d'après Juhasz and Naidu, 2000).**

HAP	Production de créosote	Stockage de bois	Usine à gaz	Pétrochimie
naphtalène	1131	3925	-	186
acénaphthalène	33	49	-	-
acénaphthène	-	1368	2	43
fluorène	650	1792	225	87
phénanthrène	1595	4434	379	156
anthracène	334	3307	156	53
fluoranthène	682	1629	2174	137
pyrène	642	1303	491	99
chrysène	614	481	345	-
benzo[a]anthracène	-	171	317	33
benzo[a]pyrène	-	82	92	15
benzo[b]fluoranthène	-	-	-	-
benzo[k]fluoranthène	-	140	498	-
dibenzo[a,h]anthracène	-	-	2451	12
indénol[1,2,3-cd]pyrène	-	23	207	-
<b>HAP TOTAUX</b>	<b>5863</b>	<b>18704</b>	<b>7337</b>	<b>821</b>

## 1.6. LES MULTIPOLLUTIONS

La pollution par les HAP est souvent associée à une contamination par d'autres polluants organiques (monoaromatiques, alyphatiques...) ou métalliques (Eléments en Trace Métalliques ou ETM). Ces problèmes de multipollution sont encore assez mal étudiés en termes de devenir et de toxicité dans l'environnement mais également en termes de méthodes de traitement de l'ensemble de la contamination.

Les ETM contenus dans les sols ont une origine naturelle, d'une part, et une origine anthropique d'autre part. Naturellement, les ETM présents dans le sol sont issus de l'héritage du fond géochimique. En zone urbaine ou industrielle, les apports anthropiques d'ETM dans l'environnement proviennent essentiellement de retombées atmosphériques, de dépôts accidentels ou non principalement issus de l'activité industrielle (usines d'incinération, hauts-fourneaux, production de briques, combustion du charbon et du pétrole), de l'activité minière (extraction de métaux) et de la circulation automobile (gaz d'échappement, particules de pneus). L'essentiel des émissions d'origine industrielle retombe sous forme de poussières dans un rayon relativement proche du site industriel émetteur (3 à 5 Km). Les contaminations

métalliques issues des transports routiers se déposent sur la chaussée ou en bordure de celle-ci (sur une largeur de moins de 100 m). En zone rurale, les apports anthropiques d'ETM dans l'environnement proviennent des engrais, des pesticides, des amendements organiques ou des effluents liquides issus des industries agro-alimentaires.

Les ETM ont des temps de résidence dans les sols se chiffrant en milliers d'années et s'avèrent dangereux pour les organismes supérieurs (Garbisu et Alkorta, 2001). Ils réduisent la croissance des plantes, leur survie et ont un effet négatif tant sur le nombre que sur l'activité des microorganismes telluriques (Bååth, 1989 ; Chaudri *et al.*, 1993, 2000 ; Mori *et al.*, 2000 ; McGrath *et al.*, 2001). Cet effet néfaste des ETM sur les microorganismes peut affecter la capacité de la microflore à dissiper les HAP (Jensen et Folker-Hansen, 1995 ; Wild and Jones, 1995 ; Van den Leemkule, 1998). En effet, Smreczak *et al.*, (1999) ont observé une augmentation de la persistance des HAP après un amendement du sol en Zn, Pb et Cd, associé à une réduction de l'activité des microorganismes. Sokhn *et al.* (2001) ont montré la réduction de la dégradation du phénanthrène et la baisse de la respiration des microorganismes à cause de fortes concentrations en cuivre (700 et 7000 mg.Kg<sup>-1</sup>). Lors d'une contamination mixte, le devenir d'un polluant est influencé par la présence d'autres polluants : la toxicité des ETM inhibe la biodégradation des HAP, tandis que la biodégradation de matières organiques pourrait conduire à une libération des métaux éventuellement complexés à celles-ci.

### 1.7. SITES POLLUES

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la réhabilitation et du traitement de la pollution de sols contaminés, qui se base en premier lieu sur un contexte légal établi par des réglementations.

#### ■ Les friches industrielles

En France, les « sites contaminés » (NF ISO 11074-1, 1997) sont définis comme des sites où se trouvent des substances dangereuses. Les « sites suspects » (NF ISO 11074-1, 1997) sont des sites potentiellement contaminés en raison de l'activité industrielle présente ou passée qui s'y est déroulée (Darmendrail, 2000).

Les anciens sites industriels sont des sites où une activité industrielle a été exercée dans le passé et sont qualifiés de friches s'ils n'ont pas retrouvé d'activité industrielle. Selon le type d'activité développée, ces sites sont plus ou moins contaminés et les contaminants ont des natures variables (hydrocarbures tels que les HAP, PolyChloroBiphényles ou PCB, ETM, multipollution). Cette contamination s'avère importante à prendre en compte tant au niveau de son impact sur l'environnement que sur la santé humaine.

Dans ce contexte, la problématique de la réhabilitation des sites pollués a pris de l'importance en France depuis les années 1990. Un siècle et demi d'histoire industrielle nous ont légué des dizaines de milliers de sites industriels anciens et ces sites pollués constituent un risque pour les eaux de surface et souterraines et pour l'usage même des sols. Le Ministère de l'Environnement s'est donné pour objectif de recenser les sites potentiellement pollués (entre 1994 et 1997), d'établir des priorités selon leur degré de contamination et de les réhabiliter en fonction de l'impact du site, suivant son usage actuel ou futur et ce, avec des coûts financiers acceptables. En France, les HAP et les PCB sont les polluants les plus fréquemment rencontrés (plus de 400 sites contaminés en HAP). Leurs teneurs sur un même site sont toutefois très hétérogènes (de 1000 à 10 000 mg.Kg<sup>-1</sup>).

Les critères d'aide à la décision quant au devenir d'un site pollué se basent sur les seuils de concentration qui dépendent des usages des sites et sur les paramètres géologiques et hydrologiques (Costes et Druelle, 1997). Ceci permet de classer les sites comme zone à banaliser, zones nécessitant d'autres investigations ou zones à surveiller conduisant à la simple surveillance du site, la limitation de ses usages, le confinement des polluants ou leur élimination par traitement.

La France ne dispose pas actuellement de cadre légal spécifique aux sites et aux sols pollués. L'action administrative s'exerce alors au travers de deux lois : loi n°76-663 (19 juillet 1976) relative aux installations classées pour la protection de l'environnement et loi n°75-633 (15 juillet 1975) relative à l'élimination des déchets et à la récupération des matériaux.

Les actions administratives se concrétisent ainsi par :

- (i) l'obligation de dépollution préalable à la vente d'un terrain sur lequel a fonctionné une installation classée,
- (ii) l'obligation de l'exploitant d'une installation classée soumise à autorisation qui veut cesser son activité d'informer le préfet et de produire un mémoire sur l'état du site et sur les travaux d'évacuation, de dépollution ou de surveillance nécessaires,
- (iii) l'obligation du responsable du site (exploitant ou détenteur) de financer les travaux de traitement et de réhabilitation des sites, ainsi que toutes les études préalables en application du principe « pollueur payeur » (confirmé par la loi n° 95-101 du 2 février 1995),
- (iv) l'obligation d'apporter des garanties financières (couverture en cas d'accidents, de pollutions et de remise en état du site après cessation d'activité) pour certaines catégories d'installations classées.

Lorsque aucun responsable solvable n'est identifié, le site est déclaré " orphelin " par le ministère de l'Environnement et les études et travaux de dépollution sont à la charge de la collectivité. Les travaux correspondants sont effectués par l'Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) qui assure la maîtrise d'ouvrage. Lorsqu'un arrêté préfectoral a stipulé la réhabilitation d'un site, les Directions Régionales de l'Industrie, de la Recherche et de l'Environnement (DRIRE) coordonnent et encadrent administrativement et techniquement les activités liées au traitement du site.

Le traitement du site s'effectue en quatre étapes :

- (i) le diagnostic de l'exploitation antérieure par une étude historique de l'activité du site et des investigations sur le terrain pour une première identification des déchets et de leur localisation,
- (ii) l'exécution d'un programme d'études techniques par des prélèvements effectués sur le terrain et des analyses chimiques afin de déterminer la nature et les teneurs des polluants effectivement présents. Différentes zones à traiter sont alors définies en fonction du degré de pollution du sol. L'évaluation des risques de dispersion des contaminants dans l'environnement se réalise par des études hydrogéologiques et de stabilité,
- (iii) le choix du procédé de traitement : les DRIRE fixent le seuil à atteindre pour la réhabilitation du site en partenariat avec le propriétaire du site et l'industriel chargé de la dépollution (seuils, délais, coûts),
- (iv) la réhabilitation par l'exécution des travaux de dépollution selon les délais et les objectifs fixés et contrôlés par un dispositif de surveillance piloté par les DRIRE.

La réhabilitation des sites contaminés se heurte à l'absence de normes françaises aussi bien sur les teneurs maximales admises pour les composés organiques dans les sols que sur les techniques d'analyse permettant d'évaluer ces teneurs. Pour fixer le seuil de dépollution à atteindre, les DRIRE s'appuient en général soit sur des normes d'analyse et de seuil étrangères (e.g: normes canadiennes), soit sur une analyse des risques permettant de quantifier le seuil en dessous duquel le polluant ne représente plus de danger pour l'environnement (étude de la nature de la pollution et de ses impacts grâce aux Valeurs de Constat d'Impact (VCI); tableaux 4 et 5). Ce seuil varie pour les HAP entre 100 et 500 mg.Kg<sup>-1</sup> en teneur totale des 16 HAP définis par la norme américaine de l' Environmental Protection Agency (EPA).

**Tableau 4 : Exemples VCI pour les ETM (d'après BRGM).**

Substances	VCI (en mg.Kg <sup>-1</sup> sol sec)	
	Usage sensible	Usage non sensible
arsenic	37	120
cadmium	20	60
chrome	130	7000
cobalt	240	1200
cuivre	190	950
mercure	7	600
molybdène	200	1000
nickel	140	900
plomb	400	2000
zinc	900	pas de valeur limite

### ■ Fabrication de l'acier

Les sols contaminés étudiés lors de ce travail sont issus d'anciens sites industriels sièges de fabrication de l'acier et de fabrication du coke.

Le terme sidérurgie désigne les techniques permettant l'obtention de la fonte de fer et de l'acier à partir de minerai. Ce terme désigne également l'industrie qui met en œuvre ces techniques. Les processus industriels aboutissant à l'obtention de fer et d'acier font intervenir de nombreuses étapes présentées dans la figure 1.

La pollution engendrée par ces processus industriels est de nature diverse et concerne l'atmosphère, les eaux résiduaires et le sol. Elle est due aux émissions qui diffusent aux abords du site et perdurent dans l'environnement même après le démantèlement des installations de surface. Le tableau 7 présente les principaux polluants associés aux différentes industries à l'origine de la fabrication de l'acier. Ainsi, les principales sources de contamination de l'environnement en HAP sont issues des cokeries et des usines d'agglomération. Les métaux lourds rejetés dans l'environnement proviennent pour la plupart des laminoirs, des hauts fourneaux et de la fabrication des aciers spéciaux. Le cyanure est un métalloïde ayant pour origine principalement les cokeries et les hauts fourneaux.

Cependant, la fabrication de l'acier, bien que source importante de pollution par les HAP, ne représente pas les activités industrielles les plus polluantes. En effet, les cokeries représentent actuellement près de 7 % de la pollution de l'environnement et 12 % si l'on inclut les usines à gaz (en 1996) (tableau 6). L'industrie des métaux ferreux, quant à elle,

représentait 18 % de la pollution en 1994. Cependant les sources de pollutions les plus importantes relevées en 1996 sont l'industrie chimique (près de 17 %) et le traitement des déchets (environ 16 %) (tableau 6).

Substances	Valeurs guides hollandaises (Kg.an <sup>-1</sup> )		Valeurs guides canadiennes (mg.Kg <sup>-1</sup> sol sec)		VCI française (mg.Kg <sup>-1</sup> sol sec)			
	Seuil de rejet dans le sol	Seuil de transfert de polluants hors du site	Seuil de fabrication, de transformation ou d'utilisation	Nécessité d'analyses approfondies	Niveau de décontamination pour un sol agricole résidentiel	Niveau de décontamination pour un sol industriel	Usage sensible	Usage non sensible
naphthalène	10	100	10 000	0,1	0,1	50	46	-
phénanthrène	-	-	-	0,1	0,1	50	-	-
anthracène	1	50	50	-	-	-	-	-
fluoranthène	-	-	-	-	-	-	6100	-
pyrène	-	-	-	0,1	0,1	100	-	-
chrysène	-	-	-	-	-	-	10350	25200
benzo[a]anthracène	-	-	-	0,1	0,1	10	14	252
benzo[a]pyrène	5	50	50	0,1	0,1	10	7	25
benzo[b]fluoranthène	5	50	50	0,1	0,1	10	-	-
benzo[k]fluoranthène	5	50	50	0,1	0,1	10	900	2520
dibenzo[a,h]anthracène	-	-	-	0,1	0,1	10	-	-
indéno[1,2,3-cd]pyrène	5	50	50	0,1	0,1	10	16	252

Tableau 5 : Exemples de valeurs guides étrangères et VCI françaises pour les HAP (d'après Wilson et Jones, 1993).

**Tableau 6: Activités industrielles sources de pollutions (recensements des sites en activités 1994 et 1996) (Darmendrail, 2000).**

Activités	Part de pollution en %	
	1994	1996
Industrie chimique, parachimique et pharmaceutique	19,5	16,9
Industrie des métaux ferreux	18,0	*
Traitements et élimination des déchets	14,3	15,6
Industrie du pétrole et du gaz naturel	10,6	12,9
Cokeries et usines à gaz de ville	9,6	12,0
Industrie des métaux non ferreux	7,0	6,0
Autres activités	21,0	14,5
<b>Nombre de sites recensés</b>	<b>669</b>	<b>896</b>

## 2. DEVENIR DES HAP DANS L'ENVIRONNEMENT

Afin d'avoir une meilleure compréhension de l'impact sur l'environnement de polluants organiques tels que les HAP, tant sur la qualité des sols que sur son effet sur les organismes telluriques, cette deuxième partie présente (i) les devenir possibles des HAP et (ii) la transformation voire la dégradation de ces polluants via des processus physico-chimiques ou biologiques.

### 2.1. CONSEQUENCES DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES SUR LE DEVENIR DES HAP

#### ■ Sorption

La persistance des HAP dans le sol dépend de leur capacité à se sorber et à se désorber aux surfaces ou aux interfaces du sol (Huang *et al.*, 2003) au niveau des argiles et de la matière organique (MO). Celle-ci représente le sorbant principal des HAP dans les sols du fait des nombreuses liaisons hydrophobes qui la constituent (Luthy *et al.*, 1997 ; Wilcke, 2000 ; Hwang *et al.*, 2003).

La sorption des HAP dans le sol se déroule avec une première phase rapide qui tend vers un équilibre relatif (adsorption sur des sites de surface de macromolécules organiques) et qui est le plus souvent réversible, suivie d'une période de sorption lente (diffusion progressive des HAP dans les sites internes) se déroulant sur plusieurs semaines voire années (Rao, 1990 ; Hatzinger et Alexander, 1995 ; Pignatello et Xing, 1996 ; White *et al.*, 1999). Les études portant sur la sorption des HAP dans les sols considèrent qu'elle suit un modèle linéaire sauf dans le cas des sols riches en MO. La non linéarité augmenterait ainsi avec la densité de la MO (Pignatello, 1998).

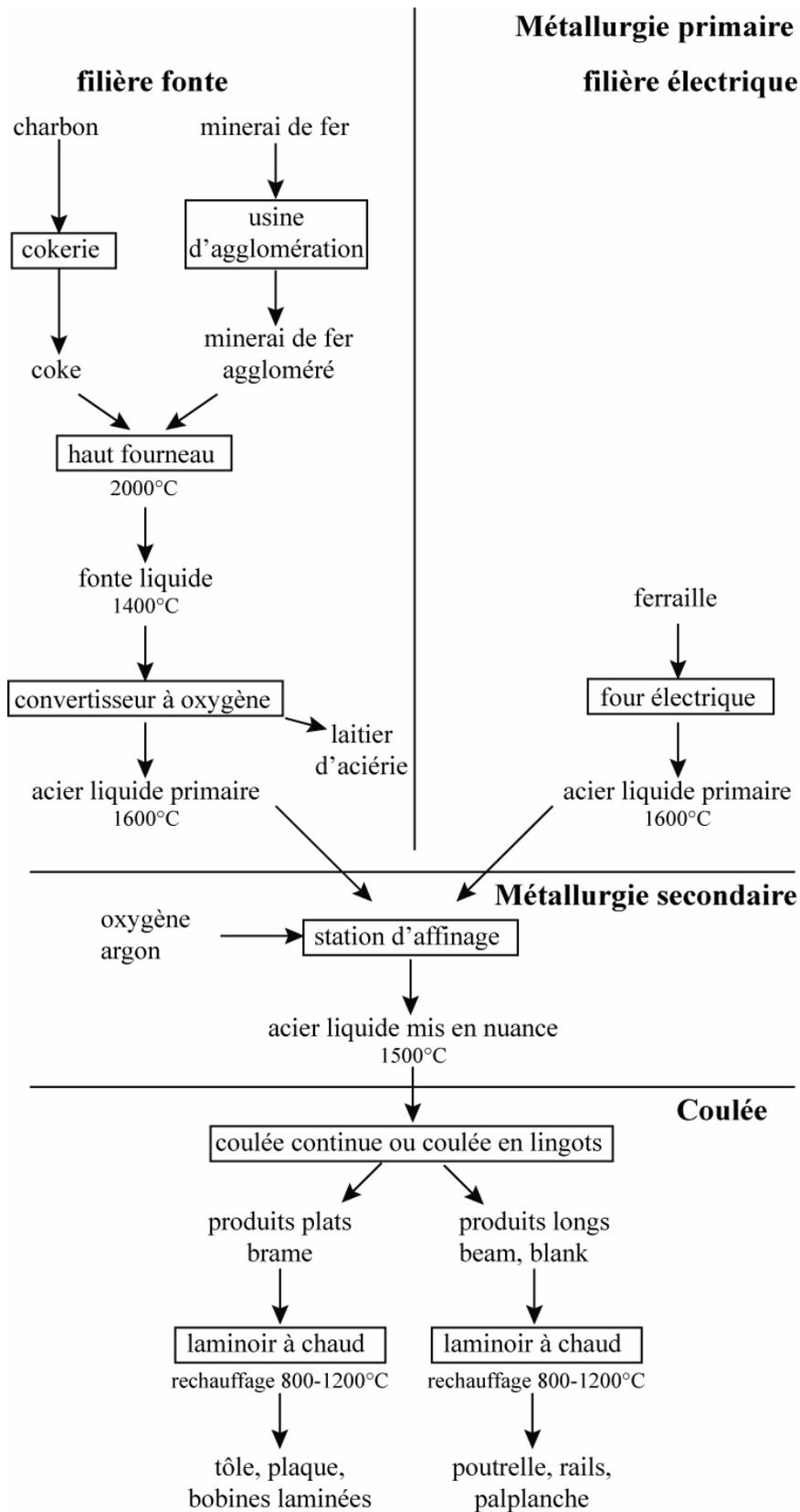


Figure 1 : Schéma de fabrication du fer et de l'acier (American Iron and Steel Institute (AISI) ; Jeannée, 2001 ; Darmendrail, 2000).

procédé de fabrication	principe	pollutions
<b>cokerie</b>	Le coke est obtenu par distillation de la houille dans un four à l'abri de l'air. Le charbon ou pâte de coke est chauffé à haute température (1000°C) et transformé en coke par élimination de l'eau, des matières volatiles (CO <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> , goudrons, hydrogène). Le coke est du carbone presque pur qui va apporter la chaleur pour la fusion du minerai de fer dans le haut fourneau et les gaz nécessaires à sa réduction.	poussière de matière première, bruit, matières en suspension, demande biologique en oxygène, pyridine, huiles acides de goudron, brai, créosote, CN, NO <sub>2</sub> , SO <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> S, HAP, CH <sub>4</sub> , C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> , NO <sub>x</sub> , CO, As, Cd, Cr, Cu, Mg, Ni, P, Pb, Zn, azote, sulfures, HAP, éthylène, propylène, butylène, acétylène, benzène, toluène, xylène, phénols
<b>usine d'agglomération</b>	Le minerai de fer est broyé et calibré en grains qui s'agglomèrent entre eux.	bruit, poussière de matière première, acide fluorhydrique, HAP, CO, NO <sub>2</sub> , SO <sub>2</sub>
<b>haut fourneau</b>	Le minerai aggloméré est concassé et chargé dans le haut fourneau avec du coke. On y ajoute un additif calcaire (castine) qui permet une meilleure évacuation des impuretés sous forme de résidu appelé laitier d'aciérie. Le fer est extrait par réduction des oxydes de fer grâce aux oxydes de carbone et la température (1200°C) provenant du coke. On obtient un mélange à base de fer appelé fonte liquide et du laitier d'aciérie liquide.	bruit, matières particulaires, composés soufrés, matières en suspension, boues, laitier d'aciérie, demande biologique en oxygène, CO, H <sub>2</sub> S, NO <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub> , SO <sub>2</sub> , chlorures, sulfates, HAP, ZnO, As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mg, Ni, Pb, Si, Zn
<b>convertisseur à oxygène</b>	La fonte en fusion est versée sur un lit de feraille. Les résidus et le carbone contenus dans la fonte sont brûlés par apport d'oxygène pur. On obtient un acier primaire impur.	bruits, carbone, matières particulaires, laitier d'aciérie
<b>station d'affinage</b>	L'acier est mis en rotation sous vide avec de l'argon (gaz neutre, pour le mouvement) et de l'oxygène. Cette étape permet de brûler les éléments indésirables (carbone et résidus) par décarburation de l'acier. Cela permet d'ajuster précisément la composition chimique de l'acier.	bruits, carbone, matières particulaires, laitier d'aciérie
<b>coulée continue coulée en lingots</b>	L'acier liquide (1500°C) est coulé dans des moules où il va se refroidir au contact des parois froides des moules. Il va ensuite prendre la forme voulue en étant guidé par un jeu de rouleaux.	bruits, matières particulaires, matières en suspension, huiles, boues
<b>laminoir à chaud</b>	Les produits issus de la coulée sont réchauffés dans un four pour rendre le métal malléable et lui donner sa forme définitive.	bruit, matières en suspension, matières particulaires, boues, huile, calamine, demande biologique en oxygène, huiles, chlorures, chromates, phosphates, sulfates, acide chlorhydrique, NO <sub>x</sub> , NO <sub>2</sub> , SO <sub>2</sub> , Al, Cd, Cr, Cu, Zn
<b>aciers spéciaux</b>	Des aciers spéciaux sont créés par addition de métaux tels que le manganèse (résistance à l'usure), le tungstène (dureté à haute température), le silicium (élasticité), le nickel et le chrome (acier inoxydable), le zinc (galvanisation).	Cr, Mg, Ni, Si, W, Zn

Tableau 7 : Procédés de fabrication et pollutions engendrées par la production du fer et de l'acier (American Iron and Steel institute (AISI) ; Jeannée, 2001 ; Darmendrail, 2000).

Il semblerait que cet écart à la linéarité soit corrélé avec le rapport atomique O/C de la MO du sol. Le modèle de partage linéaire considère la MO des sols comme une phase de type gel et amorphe, et qu'il n'y a pas de limitation du nombre de sites offerts à la sorption lorsque la concentration en soluté augmente (Karickhoff *et al.*, 1979). La disponibilité des HAP dépend également de leur fixation sur des substances humiques : un poids moléculaire élevé réduit la disponibilité du polluant par stabilisation et formation de résidus liés alors qu'un faible poids moléculaire augmente la mobilité du HAP.

Les HAP se trouvent en faibles quantités disponibles dans la solution du sol (Weissenfelds *et al.*, 1992) par leur adsorption sur les surfaces et la formation de phases non aqueuses. La présence de surfactants dans le milieu (issus de microorganismes ou de végétaux) facilite le transport des HAP de la phase solide à la phase aqueuse (Gao *et al.*, 2006).

A long terme, les HAP séquestrés dans les particules du sol évoluent. Une partie des HAP s'avère alors récalcitrante à la biodégradation : les HAP sont fixés sur les fractions de granulométrie fine du sol (Amellal *et al.*, 2001) inaccessibles aux microorganismes dégradants, ce qui limite leur désorption (Sun *et al.*, 2003).

#### ■ **Transport**

Même si la plupart des HAP se retrouvent dans les couches superficielles du sol, riches en MO, ils peuvent également se trouver dans les couches plus profondes après lessivage ou lixiviation (Wild et Jones, 1995 ; Wilcke, 2000). Le transport des HAP vers les horizons profonds se produit par l'intermédiaire de la matière organique dissoute (MOD).

## 2.2. DEGRADATION DES HAP

### 2.2.1. Voies abiotiques de dégradation des HAP

#### ■ **Volatilisation**

La volatilisation est le passage en phase gazeuse des polluants à l'interface eau-air dans les sols, avec dégazage vers l'atmosphère. Les propriétés de volatilité d'un composé sont définies à partir des paramètres de pression de vapeur (caractéristique du composé pur), de constante de Henry (caractéristique du composé dissous dans l'eau) et de solubilité (plus la solubilité d'un composé est grande et plus sa volatilité est importante).

Les HAP de faible poids moléculaire sont très volatils. Dans le sol, la volatilisation est fonction de l'humidité (Ophoff *et al.*, 1996), du niveau d'adsorption du composé, ou encore du

potentiel redox (Wilcke, 2000). Le vent, les perturbations atmosphériques et la température jouent également un rôle au niveau de ce mécanisme (Sims et Overcash, 1983).

### ■ Oxydation

La transformation ou la dégradation des HAP par voie chimique se fait soit par oxydation chimique soit par photooxydation sous l'action des rayonnements ultraviolets (UV), de l'ozone, du peroxyde d'hydrogène, du dioxygène ou de radicaux -OH (Heitzer et Sayler, 1993 ; Lehto *et al.*, 2003).

Les HAP absorbent la lumière dans le spectre du visible (400-700 nm) et des ultraviolets (290-400 nm). La photooxydation des HAP est une importante voie de transformation de ces composés (Huang *et al.*, 1993) qui forment rapidement, après une exposition à la lumière, des molécules pouvant être plus toxiques que le composé d'origine (Mallakin *et al.*, 1999). Mallakin *et al.* (1999) ont étudié la dégradation solaire de l'anthracène qui absorbe fortement les UV-A (320-400 nm) et les UV-B (290-320 nm) susceptibles de permettre l'attaque par O<sub>2</sub> de l'orbitale  $\pi$  peu stable. Ces auteurs ont montré que l'attaque initiale par O<sub>2</sub> est spécifique et se fait exclusivement en position 9,10 du noyau central de l'anthracène.

Les molécules intermédiaires photoinduites peuvent servir de substrats augmentant la biodégradation de la molécule initiale (Dyrborg, 1996). La contribution de la photodégradation pour la biodégradation est particulièrement importante car elle est rapide et se traduit préférentiellement par l'attaque de l'atome de carbone terminal qui tend à limiter l'attaque biologique. Letho *et al.* (2003) ont observé une augmentation de la biodégradation de l'anthracène, du pyrène et du benzo[a]anthracène préalablement irradiés aux UV et traités individuellement en présence de *Sphingomonas* sp. (Souche EPA 505) et *Sphingomonas yanoikuyae*. Ces auteurs ont montré, par exemple, que l'anthracène irradié sera biodégradé plus rapidement que le même composé non irradié (300 h/480 h).

Les produits de l'oxydation du naphthalène (*e.g.*: 1-naphthol, 1,2-naphthoquinone) sont impliqués indirectement dans la cytotoxicité du naphthalène (Wilson *et al.*, 1996) et augmentent sa toxicité pour les plantes (Ren *et al.*, 1994).

Masten et Davies (1997) ont obtenu des rendements de plus de 95 % d'élimination du phénanthrène pour une durée d'ozonation de 2,3 heures et un flux d'ozone de 250 mg.h<sup>-1</sup>. En ce qui concerne le pyrène, 91 % est éliminé après 4 heures de traitement et un flux d'ozone de 600 mg.h<sup>-1</sup>. L'eau oxygénée est utilisée pour dégrader directement les composés organiques complexes et réfractaires à la biodégradation. Son action peut être catalysée par l'action des

rayons ultra-violetes ou du fer ferreux (Réactif de Fenton), qui activent la décomposition du peroxyde d'hydrogène en radicaux OH<sup>-</sup>.

Il est ainsi possible de dégrader les HAP exclusivement par voie chimique ou en associant la dégradation biotique à la dégradation abiotique. Ainsi des technologies de décontamination des HAP s'associent aux dégradations chimiques et biologiques :

- (i) ozonation et biodégradation (Zeng *et al.*, 2000). Haessler *et al.* (1993) ont étudié le couplage ozonation/biodégradation aérobie par des bactéries dégradant les HAP. Le naphthalène ozoné avec une dose élevée (240 minutes d'ozonation) a été biodégradé tandis que des doses d'ozone plus faibles ont conduit à des produits ayant un effet bactéricide,
- (ii) oxydation Fenton et biodégradation (Lee et Hosomi, 2001),
- (iii) photooxydation et biodégradation (Dutta et Harayama, 2000).

### **2.2.2. Voies biotiques de dégradation des HAP**

#### **■ Généralités**

Les HAP sont biodégradés soit directement en servant de source de carbone, soit indirectement par co-métabolisme. La biodégradation est la transformation biologique d'un composé organique sous une autre forme (Grady, 1985). Ce mécanisme convertit une substance métabolisable en un composé plus simple, qui peut être moins ou plus toxique que le composé d'origine (biotransformation) et aboutit à un produit final qui est le dioxyde de carbone (minéralisation). Lors de cette dégradation, le composé peut servir ou non d'unique source de carbone aux microorganismes. S'ils en sont incapables, ils doivent utiliser une autre source de carbone (Grady, 1985 ; Lappin *et al.*, 1985).

Le cométabolisme est défini comme la transformation d'un substrat ne servant pas à la division cellulaire en présence obligatoire d'un substrat de croissance ou d'un autre composé assimilable (Dalton et Stirling, 1982). Les HAP de faible poids moléculaire peuvent être entièrement biodégradés, en revanche, les HAP de haut poids moléculaire, c'est-à-dire comportant plus de cycles, ne sont pas dégradés directement. Leur biodégradation nécessite l'intervention d'un cortège de microorganismes par cométabolisme (Chen et Aitken, 1999).

La biodégradation se réalise soit en conditions aérobies, les molécules sont alors dégradées par des réactions d'oxygénation, soit en conditions anaérobies (conditions dénitrifiantes, sulfato-réductrices ou méthanogènes) par différents groupes de microorganismes.

Les microorganismes impliqués dans la biodégradation des HAP sont principalement des bactéries ou des champignons hétérotrophes, qui utilisent les HAP ou un autre composé organique comme source de carbone ou qui les dégradent par cométabolisme.

Les mécanismes de dégradation aérobie des HAP par les eucaryotes et par les procaryotes nécessitent, en général, la présence d'oxygène pour réaliser la première étape de la dégradation, c'est-à-dire l'attaque enzymatique des HAP. La biodégradation est réalisée par des microorganismes variés possédant des systèmes enzymatiques différents tels que des dioxygénases, des monooxygénases, des laccases, des manganèse et des lignine peroxydases (Aust, 1990). Les différentes voies de biodégradation sont présentées dans la figure 2 et sont détaillées par la suite.

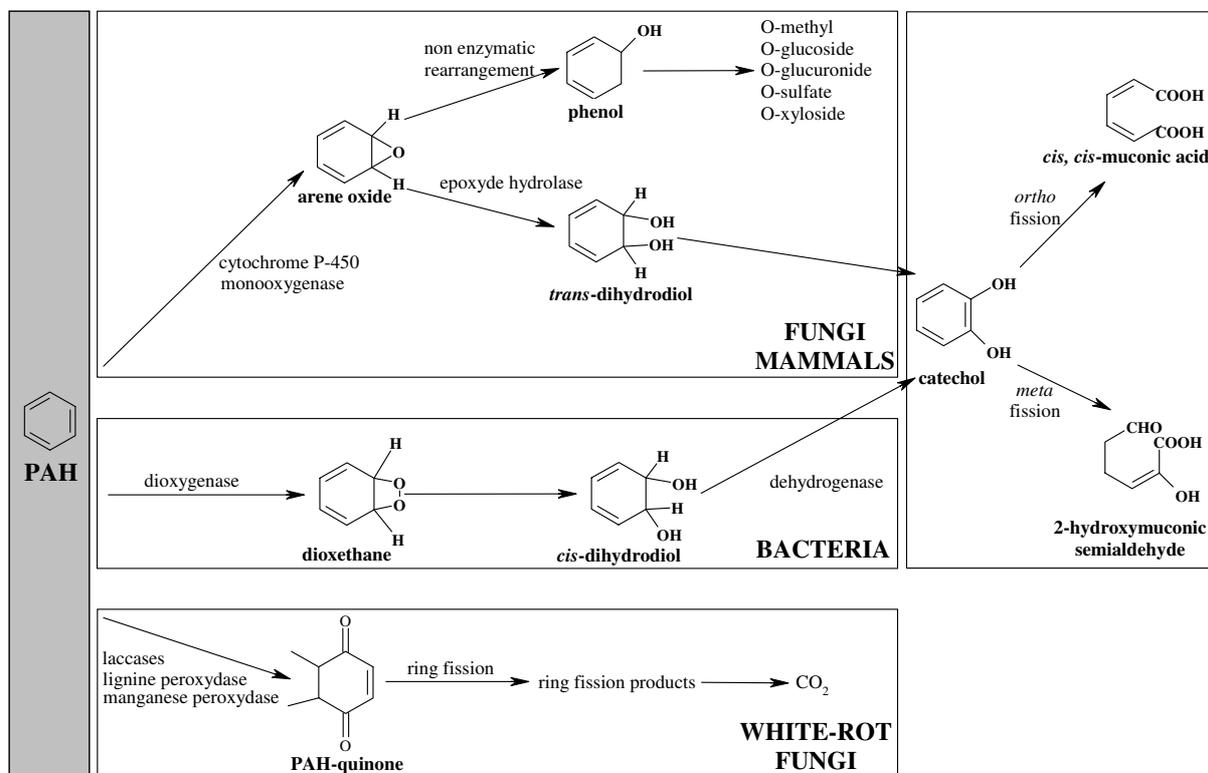


Figure 2 : Différentes voies de dégradation des HAP (adapté de Cerniglia, 1997).

## ■ Voies bactériennes

### □ Mécanismes de dégradation

Le métabolisme bactérien est le processus majeur de dégradation des HAP dans les sols. (Cerniglia, 1997). Cette dégradation peut être plus ou moins partielle et met en jeu de nombreuses genres bactériens Gram + et Gram -: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, et *Mycobacterium* (d'après les références dans Johnsen *et al.*, 2005). Ces dernières agissent directement sur les HAP pour les métaboliser et les utiliser

comme source de carbone (Dean-Ross et Cerniglia, 1996), ou indirectement en utilisant les substrats issus d'une partie de la dégradation des HAP avec des phénomènes de cométabolisme.

L'étude de la biodégradation des HAP par des souches bactériennes isolées à partir de sols contaminés a permis d'établir des voies métaboliques de dégradation, d'analyser l'organisation et la régulation des gènes qui codent les enzymes impliquées dans la dégradation (Saito *et al.*, 2000).

Cette biodégradation se fait le plus souvent en conditions aérobies (Kanaly et Harayama, 2000 ; Samanta *et al.*, 2002) mais peut avoir lieu en conditions anaérobies dans les sédiments par exemple.

Cette dégradation est fonction du coefficient de partage octanol/eau : plus il est important et moins le composé est biodégradable (Erickson *et al.*, 2000). Les HAP lourds sont ainsi préférentiellement dégradés par co-métabolisme, via un HAP plus léger (source de carbone supplémentaire), plutôt que directement (Heitkamp et Cerniglia, 1988 ; Juhasz *et al.*, 1997 ; Ho *et al.*, 2000 ; Juhasz et Naidu, 2000 ; Kanaly et Harayama, 2000).

Le processus de biodégradation est un phénomène complexe et largement dépendant des conditions affectant l'activité bactérienne, à savoir la toxicité des polluants, les conditions environnementales, comme la structure du sol (Erickson *et al.* 2000) ou la biodisponibilité des éléments nutritifs. La présence d'autres contaminants (ETM ou cyanures) peut ralentir, voire inhiber les processus métaboliques des bactéries (Hurst *et al.*, 1996). Dans le cas d'une contamination ancienne, les HAP diffusent lentement dans la MO et la biodégradation est réduite (Hatzinger et Alexander, 1995).

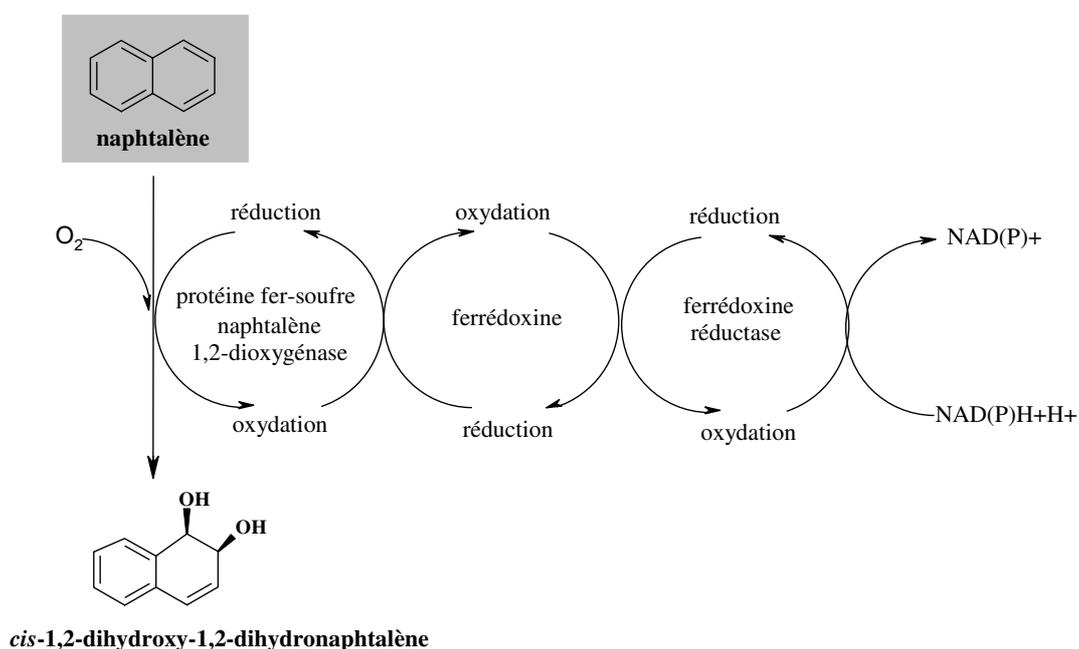
Les voies métaboliques bactériennes de dégradation des HAP suivent le même schéma pour tous les composés de même poids moléculaire. Les structures des enzymes et les réactions ont été conservées au cours de l'évolution chez les bactéries dégradantes (Gibson et Parales, 2000 ; Wilson *et al.*, 1999a et 1999b). La différence entre les voies de dégradation d'un HAP par rapport à un autre réside au niveau des produits intermédiaires et finaux. La dégradation est d'autant plus complexe que le HAP est de poids moléculaire élevé. Les voies métaboliques bactériennes de dégradation des HAP connues sont répertoriées sur le site <http://umbbd.ahc.umn.edu/index.html>.

#### □ Voies de dégradation

Les études se sont principalement axées sur la biodégradation du naphthalène par les *Pseudomonas*. Le naphthalène sert de HAP modèle dans l'étude de la dégradation bactérienne des HAP car il s'agit du HAP ayant le plus faible poids moléculaire. Pour la première fois

étudiée par Davies et Evans (1964) pour des bactéries du genre *Pseudomonas*, cette voie métabolique débute par l'action d'une dioxygénase. Cette dioxygénase porte des noms variables selon les auteurs : naphthalène dioxygénase (NDO), PAH-ring hydroxylating dioxygenase alpha subunit (PAH-RHD $\alpha$ ) (Cebron *et al.*, *in press*).

La dégradation du naphthalène, présentée dans les figures 3 et 4, débute par l'attaque du noyau aromatique du HAP (introduction de deux atomes d'oxygène) grâce à la NDO. Ceci donne lieu à un composé de type *cis*-dihydrodiol (Cerniglia, 1992). La dioxygénase est un système enzymatique composé d'une sous unité réductase, d'une sous unité ferredoxine et d'une protéine fer-soufre (Gibson *et al.*, 1995). Cette première oxydation peut avoir lieu en position *ortho*- ou *para*- de la molécule.



**Figure 3 : Oxydation initiale du naphthalène en *cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalène par la naphthalène-1,2-dioxygénase (d'après Habe et Omori, 2003).**

Une seconde étape a lieu par rupture du *cis*-dihydrodiol par une dihydrodiol déshydrogénase (voie *ortho*- ou voie *méta*- des groupes hydroxyles). Les sous-produits ainsi obtenus sont transformés en intermédiaires carboxyliques. Tous les cycles sont alors dissociés et dégradés les uns après les autres pour conduire à des intermédiaires à simple cycle, comme l'acide benzoïque, l'acide salicylique, l'acide phthalique ou le catéchol.

Les HAP de 2 à 3 noyaux aromatiques et les HAP de « haut poids moléculaire » (au moins 4 cycles) ont des voies de dégradation différentes mettant en jeu différentes enzymes. Cependant peu d'informations sont disponibles sur les enzymes de dégradation des HAP de haut poids moléculaire. Les voies de dégradation pour les HAP de trois cycles, comme

l'acénaphène, le fluorène, l'antracène et le phénanthrène suivent le même modèle avec action des dioxygénases pour former des dihydrodiols (figure 4).

Les HAP de hauts poids moléculaires (figure 5) sont beaucoup plus récalcitrants à la biodégradation (Cerniglia, 1992 ; Wilson et Jones, 1993) mais certaines souches bactériennes sont capables de cométaboliser le benzo[a]anthracène et le benzo[a]pyrène comme l'ont montré Gibson *et al.* (1975) pour *Sphingomonas yanoikuyae* B1 et Schneider *et al.*, (1996) pour *Mycobacterium* sp. RJGII-135. *Sphingomonas paucimobilis* peut dégrader le benzo[a]pyrène avec des rendements de 5 % après 168h d'incubation avec du fluoranthène. Cette dégradation peut atteindre 40 % si l'incubation se réalise avec du fluoranthène et 100 mg.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure (Ye *et al.*, 1996).

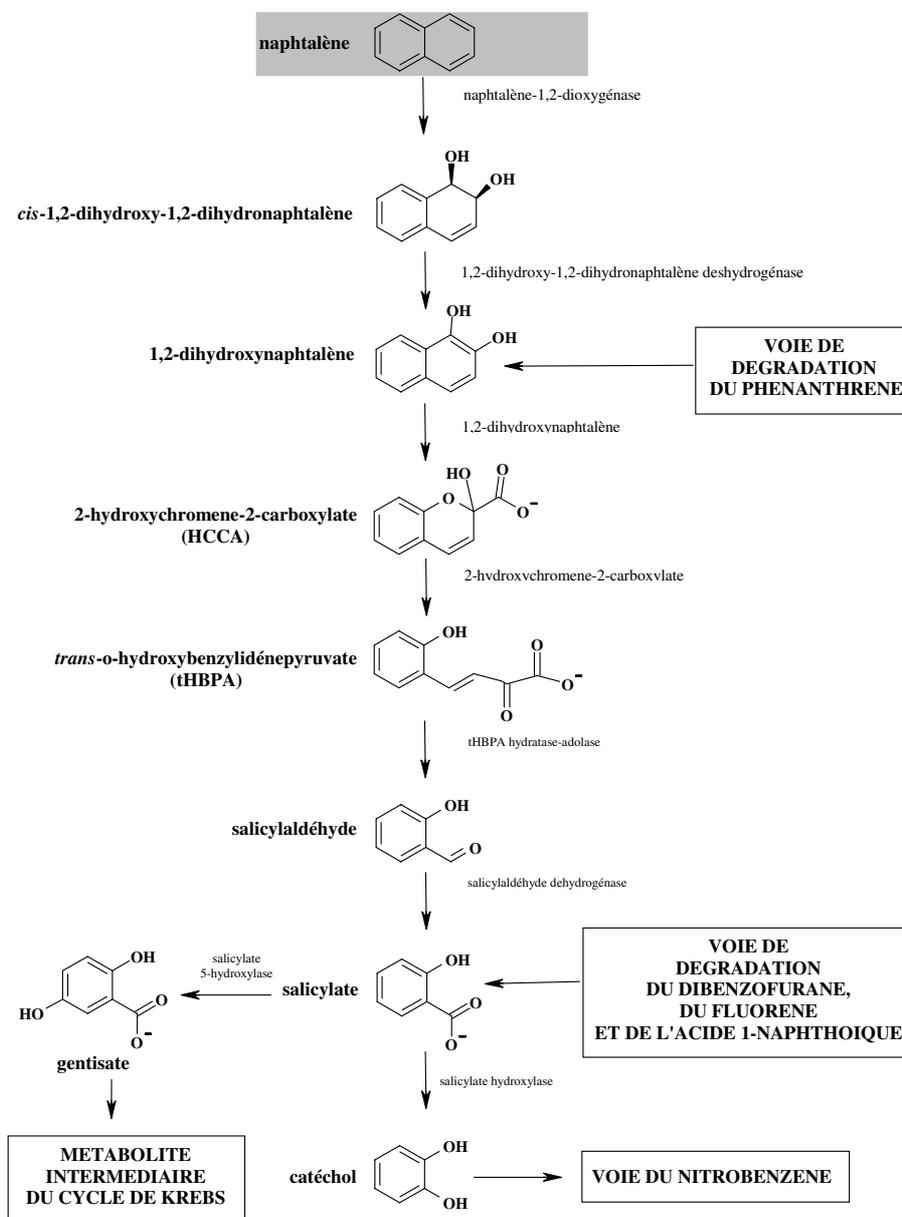


Figure 4: Voie de dégradation du naphthalène par *Pseudomonas* sp ; NCIB 9816-4, G7, (<http://umbbd.ahc.umn.edu>).

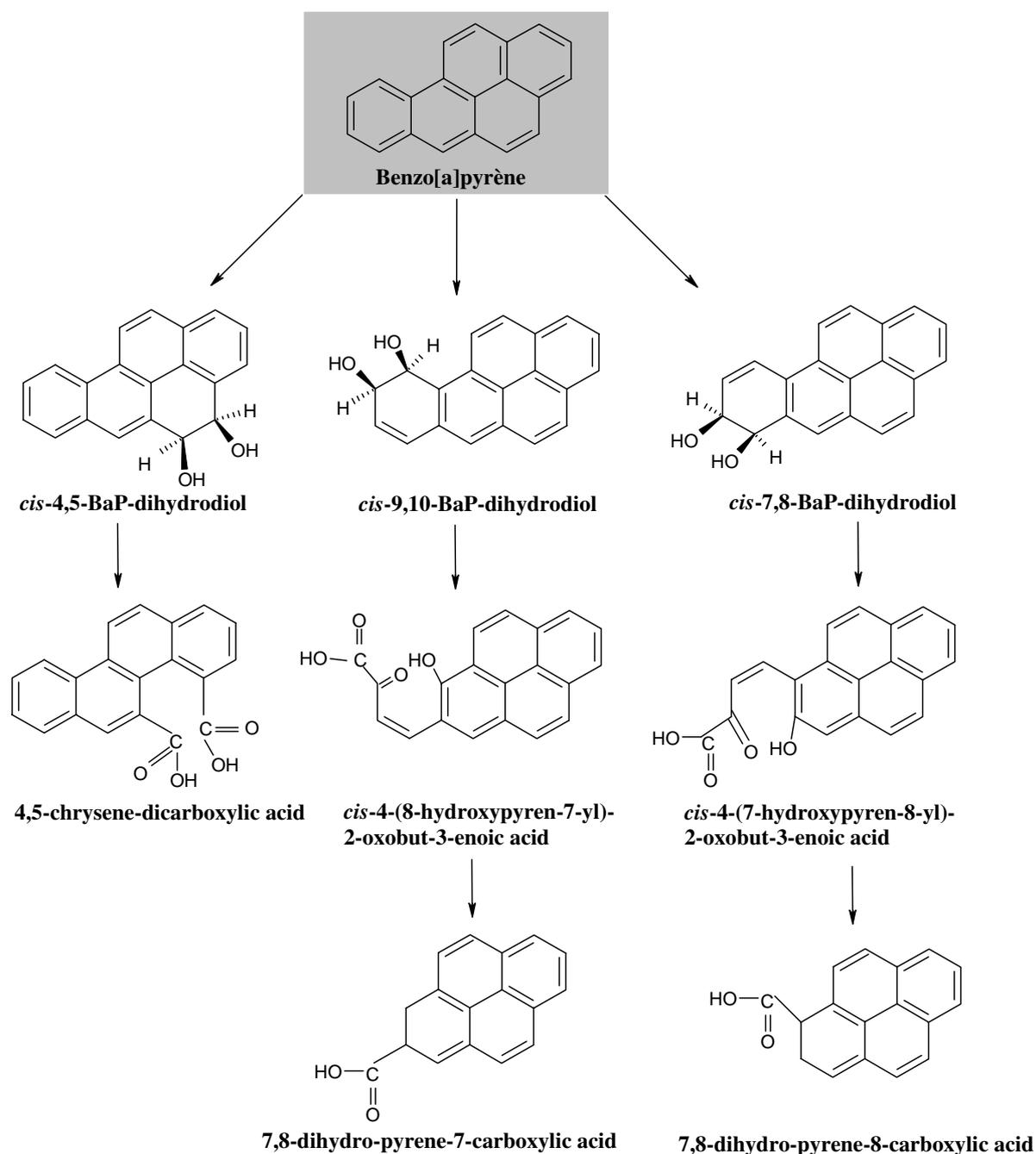


Figure 5: Schéma simplifié des voies de dégradation du benzo[a]pyrène par les bactéries (d'après Juhasz et Naidu, 2000).

#### □ Gènes intervenant dans la dégradation

Des souches de *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Comamonas* et *Rhodococcus* capables de dégrader le naphthalène ont été isolées (Simon *et al.*, 1993 ; Fredrickson *et al.*, 1995). Les gènes codant les enzymes de dégradation du naphthalène en général sont portés sur des plasmides (Yen et Gunsalus, 1982) ou sur l'ADN génomique

(Zuniga *et al.*, 1981) où ils sont la plupart du temps organisés en opérons (Zylstra *et al.*, 1994 ; Providenti *et al.*, 1995 ; Johnsen *et al.*, 2005).

L'ensemble des données génétiques acquises sur les dioxygénases terminales permet aujourd'hui de corrélérer la phylogénie des bactéries avec leur fonction. En effet, Habe et Omori, (2003) (figure 6) ont réalisé l'alignement des séquences des gènes codant les sous-unités  $\alpha$  d'un grand nombre de dioxygénases intervenant dans la dégradation de diverses molécules cycliques (HAP, phenylpropionate, benzène...). Ils ont ainsi montré que les NDO forment deux branches phylogénétiques correspondant aux bactéries Gram + et Gram - capables de dégrader les HAP.

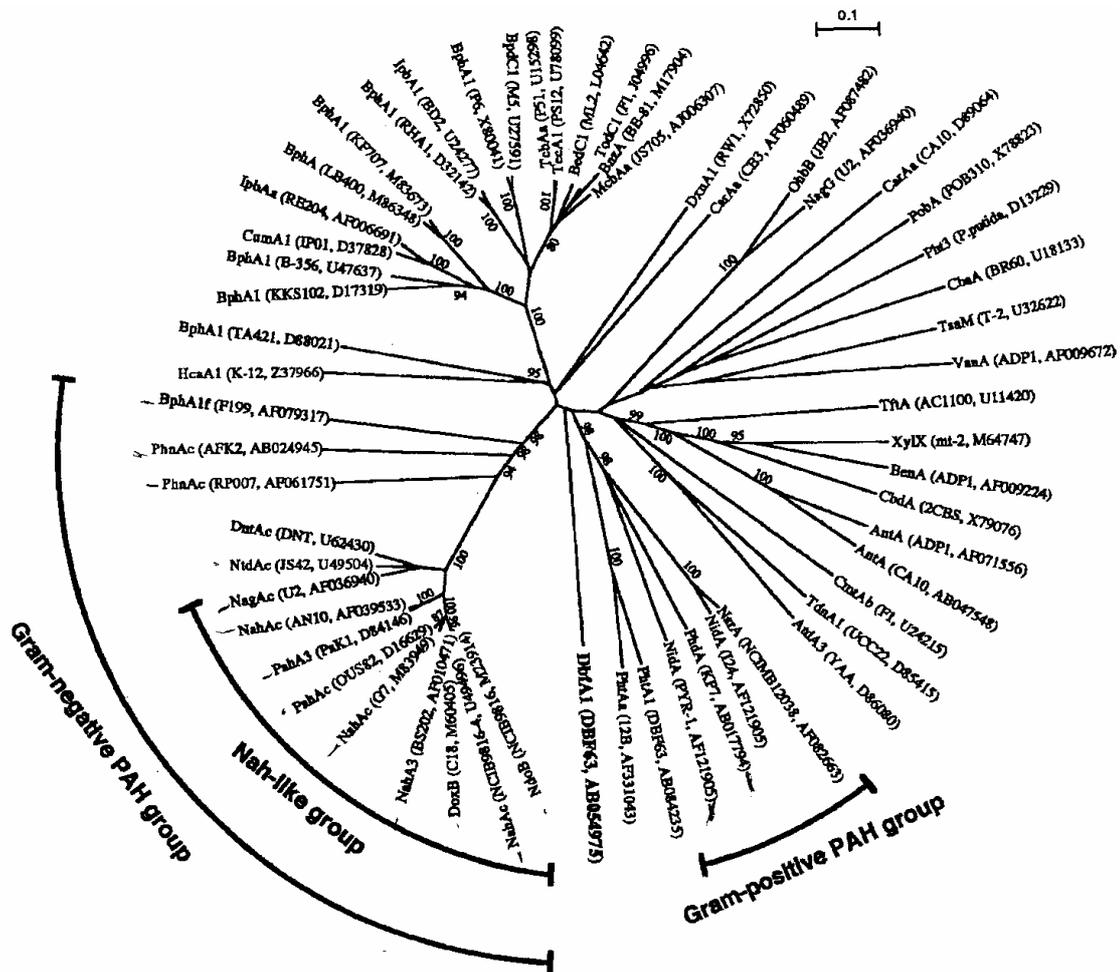


Figure 6 : Arbre phylogénétique construit à partir d'alignement des sous-unités  $\alpha$  de la dioxygénase (d'après Habe et Omori, 2003).

Ces connaissances génétiques permettent de cibler les groupes bactériens fonctionnels, à l'aide d'outils moléculaires tels que la PCR en temps réel, et de quantifier les bactéries qui dégradent les HAP et qui portent le gène codant la NDO (Cebron *et al.*, *in press*).

Park et Crowley (2006) ont mis en évidence la relation entre le taux de dégradation du naphthalène et le nombre de copies de gène *nahAc* codant la NDO. Cette étude utilisait un sol artificiellement contaminé à 30 mg.Kg<sup>-1</sup> de naphthalène dans la solution du sol. Le nombre de copies du gène codant la NDO de *Pseudomonas putida* G7 est passé de 1.10<sup>4</sup> copies à l'origine contre 1.10<sup>7</sup> après 6 jours d'exposition aux HAP, sans que la quantité de bactéries augmente (même nombre de copies de gène 16S). Wilson *et al.*, (2003) ont montré, dans des sols pollués en HAP, l'existence d'un transfert de l'allèle *phnAc* codant la sous-unité  $\alpha$  de la dioxygénase montrant l'adaptation des communautés bactériennes aux polluants.

#### ■ Voies fongiques

Chez les Zygomycètes (*e.g. Cunninghamella elegans, Penicillium sp, Aspergillus sp*) la voie de dégradation des HAP est similaire à celle observée chez les mammifères (Smith et Rosazza, 1974) et fait intervenir une monooxygénase à cytochrome P-450 pour obtenir des composés trans-dihydrodiols (Cerniglia *et al.*, 1994 ; Cerniglia, 1997) comme le présente la figure 2.

Chez les champignons Basidiomycètes lignolytiques « de la pourriture blanche » (*e.g. Phanerochete chrysosporium, Trametes versicolor, Pleurotus ostreatus, Pycnoporus cinnabarinus* et *Bjerkandera adusta*) le mécanisme est différent et s'appuie sur le fait que la lignine et les HAP ont des analogies moléculaires (Garon *et al.*, 2000). Ainsi le complexe lignine peroxydase ou manganèse peroxydase, spécifique de la dégradation de la lignine, peut attaquer les HAP. Les laccases peuvent également dégrader les HAP en créant une double liaison entre un atome de carbone du cycle benzénique et un atome d'oxygène pour aboutir à un composé de type quinone (Hammel, 1992 ; Cerniglia *et al.*, 1994 ; Harayama, 1997 ; Boyle *et al.*, 1998) (figures 2 et 7).

Quelle que soit la voie métabolique, la dégradation des HAP par les champignons est basée sur des réactions enzymatiques extracellulaires où le composé n'est pas la seule source de carbone (Cerniglia *et al.*, 1994). La production d'enzymes extracellulaires à l'action peu spécifique permet de transformer tous les HAP et offre un avantage dans le cas où les HAP sont difficilement disponibles. En revanche, ces métabolismes ont pour inconvénient d'être peu rapides et n'aboutissent pas à la dégradation complète du composé (Cerniglia *et al.*, 1994). En général, les produits métabolisés sont pris en charge par la suite par le métabolisme bactérien jusqu'à une dégradation totale. Ces champignons, qui ne se développent qu'en présence d'une source de carbone annexe, participent donc à un cométabolisme faisant intervenir les activités métaboliques bactériennes (Sutherland *et al.*, 1995 ; Gramss *et al.*, 1999b et 1999c).

PARTIE I - Synthèse bibliographique

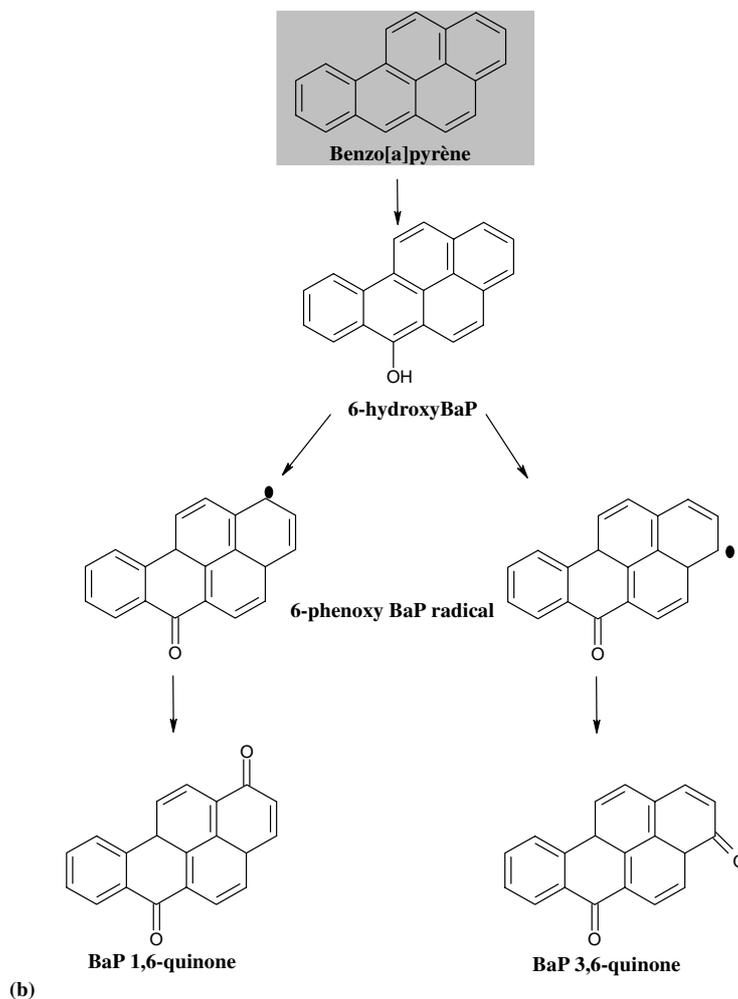
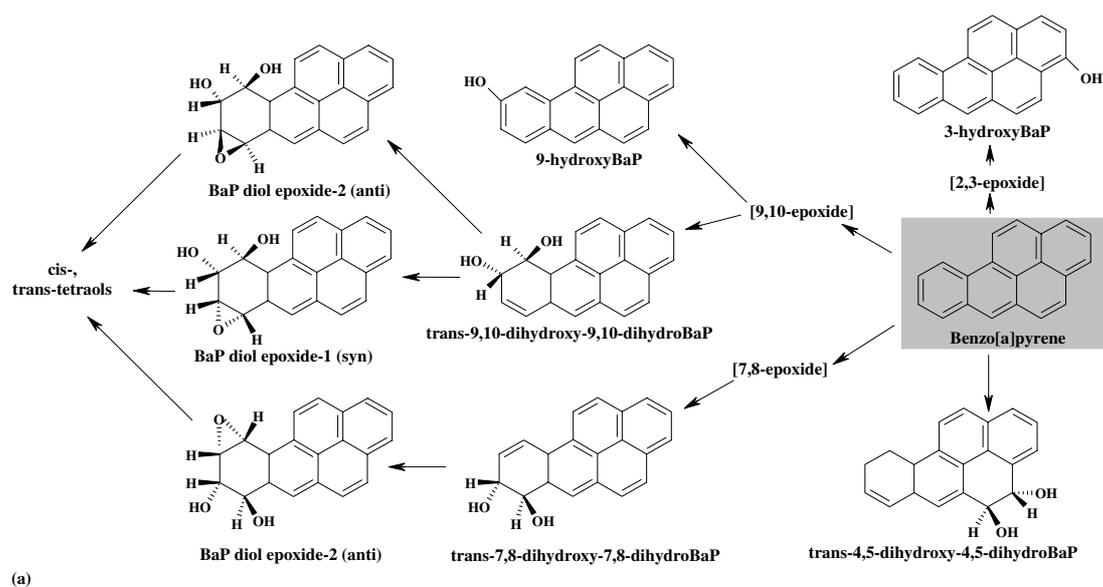


Figure 7 : (a) Schéma des produits de transformation du benzo[a]pyrène par les champignons et (b) Benzo[a]pyrène-quinones produites par l'oxydation du benzo[a]pyrène par les champignons (d'après Juhasz et Naidu, 2000).

Les champignons mycorhiziens à arbuscules ne possèdent pas d'activité de dégradation des HAP reconnue. Criquet *et al.*, (2000) n'ont pas mis en évidence d'augmentation d'activité laccase par le champignon mycorhizien *Glomus mosseae* P2 (BEG 69) dans le cas d'une culture de luzerne exposée ou non à 500 mg.Kg<sup>-1</sup> d'anthracène. Cependant Verdin *et al.* (2006) montrent que le champignon mycorhizien *Glomus intraradices*, dans le cas d'une culture de racines transformées d'endive mycorhizées *in vitro*, permet la dissipation de l'anthracène *via* une accumulation dans des vésicules lipidiques. Joner et Leyval (2003b) et Joner *et al.* (2001) ont montré que les champignons MA contribuent indirectement à augmenter la biodégradation des HAP dans la rhizosphère des plantes en modifiant les communautés microbiennes associées à la rhizosphère.

La plupart des expériences de biodégradation sont réalisées à l'aide de cultures pures de microorganismes isolés de sols, de sédiments ou d'eaux naturelles. Les mécanismes de biodégradation au sein d'un consortium bactérien ou associant champignons et bactéries ont, en revanche, été peu étudiés. De la même façon, de par la complexité de ces processus de dégradation, il n'existe que peu de données relatives à la dégradation d'un mélange de HAP. Il est ainsi difficile de connaître d'un point de vue biologique les mécanismes de dégradation réellement mis en jeu dans le sol, d'autant qu'ils peuvent interagir avec les mécanismes physico-chimiques.

### 3. LES HAP DANS LA RHIZOSPHERE

Cette troisième partie traite, (i) de la rhizosphère et des organismes qui s'y trouvent et (ii) des devenir possibles des HAP dans la rhizosphère.

#### 3.1. TERMINOLOGIE

Le terme **rhizosphère** (du grec *rhiza*, la racine et de sphère, domaine d'influence) a été utilisé pour la première fois par Lorenz Hiltner (1904) pour définir la zone de sol sous l'influence des racines de légumineuses. La rhizosphère définit aujourd'hui le lieu d'interactions entre le sol, la plante et les microorganismes. Ces interactions dépendent des conditions physico-chimiques du milieu et des organismes mis en jeu.

La rhizosphère est en fait un microhabitat dont les limites sont mal définies car il représente un gradient microbiologique et physico-chimique allant de la racine elle-même, au contact de laquelle la microflore présente les différences les plus marquées, jusqu'à une distance plus ou moins grande (1 à 5 mm) (Rovira et Davey, 1971) au-delà de laquelle l'« effet rhizosphérique » disparaît.

Pinton *et al.* (2001) et Gobat *et al.* (1998) distinguent ainsi :

(i) l'**ectorhizosphère** (Balandreau et Knowles, 1978) correspond au volume de sol colonisé ou potentiellement colonisable par les microorganismes (bactéries ou champignons) et influencé par ceux-ci. Sa définition peut s'étendre à la **mycorrhizosphère** correspondant au volume de sol qui environne une racine colonisée par un champignon mycorhizien (le champignon mycorhizien permet d'augmenter le volume de l'ectorhizosphère) (voir paragraphe 3.1.),

(ii) l'**endorhizosphère** (Balandreau et Knowles, 1978) correspond au volume de tissus racinaires, parmi laquelle on distingue également :

(a) le **rhizoplan** (Clark, 1949) correspondant à la surface même du tissu racinaire,

(b) l'**histosphère** correspondant à la région intra-tissulaire et extra-cellulaire de la racine où se trouvent les microorganismes,

(c) la **cytosphère** correspondant à la région intra-tissulaire et intra-cellulaire de la racine où se trouvent les microorganismes.

## 3.2. ORGANISMES DE LA RHIZOSPHERE

### 3.2.1. Les plantes

Le premier processus qui intervient dans la rhizosphère est commandé par les racines. Les racines des plantes opèrent des changements qualitatifs et quantitatifs du sol qui les entoure, de façon physique par leur croissance et chimique par leur exsudation. Elles modifient les propriétés physico-chimiques du sol tant au niveau de sa microporosité que de sa macroporosité (modification de pH, de potentiel redox, de température, d'aération, d'humidité, de salinité...) qui conduisent à des modifications des propriétés biologiques et microbiologiques. La plante transforme sa rhizosphère par absorption d'eau, d'oxygène, d'ions et par production d'exsudats racinaires (Darrah, 1991).

La **rhizodéposition** correspond à l'ensemble des composés libérés par les microorganismes de la rhizosphère. Rovira (1969) définit le terme **exsudat** comme l'ensemble des substances organiques libérées par les racines vivantes. En 1979, Rovira *et al.* affineront cette définition en distinguant :

(i) les **exsudats sensus stricto** (composés de faible poids moléculaire) libérés passivement par des phénomènes de diffusion,

- (ii) les **sécrétions** (enzymes, protons, électrons, sidérophores...) libérées par des processus métaboliques actifs,
- (iii) les **mucilages** (polysaccharides...) produits par la coiffe racinaire et les cellules épidermiques (Foster, 1986),
- (iv) le **mucigel** (composés gélatineux polysaccharidiques de type hexoses, pentoses et acides uroniques) (Oades, 1978) issu à la fois des mucilages végétaux, microbiens (Rovira et Campbell, 1974) et des particules organiques et inorganiques du sol,
- (v) les **lysats** composés des poils absorbants, des cellules détachées de la coiffe, des contenus cellulaires, des parois cellulaires, des tissus rhizodermiques et corticaux qui sont autolysés.

Le mucilage sécrété par la racine (en particulier au niveau de la coiffe) s'avère être important pour la protection de la racine de (i) la dessiccation, (ii) la lubrification, (iii) l'agrégation des microorganismes et des particules de sol (Gobat *et al.*, 1998) et (iv) l'amélioration de la nutrition minérale de la plante.

Les racines reçoivent 30 à 60 % du carbone photosynthétique et en libèrent 10 à 20% par rhizodéposition (Salt *et al.*, 1998 ; Marschner, 1995 ). Typiquement, la concentration des acides organiques libérés par les racines atteint 10 à 20 mM (lactate, acetate, oxalate, succinate, fumarate, malate, citrate, isocitrate, aconitate) (Jones, 1998). Parmi les autres composés se trouvent des sucres (90 mM) et des acides aminés (10 à 20 mM).

L'exsudation racinaire est un phénomène à la fois passif lorsqu'il est lié à la perméabilité de la membrane racinaire et à la diffusion, et actif par l'excrétion des ions. Elle dépend de différents facteurs comme (i) l'espèce végétale (Rovira, 1956 ; Rovira, 1959 ; Rao, 1990 ; Salt *et al.*, 1998), (ii) l'âge de celle-ci, (iii) son génotype (Grayston *et al.*, 1998), (iv) son statut nutritif (Trolldenier, 1975), (v) sa symbiose avec un champignon MA (Marschner *et al.*, 1997) et (vi) ses conditions de culture (la lumière et la température) (Rovira et Davey, 1974). L'absorption de l'eau du sol par la racine via les poils absorbants augmente l'aération du sol. L'absorption des ions par des pompes à protons intervient sur le pH et la respiration racinaire contribue à l'abaissement de la concentration en oxygène de la rhizosphère (Darrah, 1991).

La teneur en dioxyde de carbone est généralement plus importante dans la rhizosphère par rapport à un sol nu. La concentration en oxygène, le potentiel osmotique, le potentiel redox sont également influencés par la présence de végétation (Curl et Truelove, 1986). Le

pH de la rhizosphère, qui peut varier de 1 à 2 unités (Anderson *et al.*, 1993), est directement influencé par le prélèvement racinaire des ions et dépend des conditions nutritives (Mugwira *et al.*, 1978). Ainsi, une carence en P et  $\text{Fe}^{2+}$  peut induire une diminution du pH rhizosphérique, tandis que des concentrations toxiques de  $\text{Al}^{3+}$  peuvent l'augmenter.

Certaines caractéristiques physico-chimiques de la rhizosphère (pH, potentiel d'oxydo-réduction, production d'exsudats, de mucilages, d'enzymes...) peuvent avoir des conséquences importantes vis-à-vis de la mobilité et de la disponibilité de polluants organiques ou métalliques (Hsu et Bartha, 1979 ; Adriano, 1986 ; Alloway, 1990 ; Kabata-Pendias et Pendias, 1992).

### **3.2.2. Les microorganismes de la rhizosphère**

Les modifications du sol rhizosphérique par les exsudats racinaires correspondent à un important processus qui influence les populations microbiennes. Les microorganismes de la rhizosphère sont stimulés par les apports carbonés des plantes (Rovira, 1965), on parle alors d'« effet rhizosphère ». Rouatt et Katznelson (1961) ont montré que le nombre de microorganismes de la rhizosphère diminue de manière inversement proportionnelle à la distance aux racines et que l'« effet rhizosphère » (nombre de microorganismes dans le sol rhizosphérique/sol non rhizosphérique, R/S) varie d'une plante à l'autre. Bodelier *et al.* (1997) estiment que les microorganismes présents dans le sol rhizosphérique sont 19 à 32 fois plus nombreux que dans le sol hors d'influence de la plante. Ce rapport R/S varie de 5 à 20 d'un sol à l'autre et peut atteindre 100 (Anderson *et al.*, 1993).

Les microorganismes de la rhizosphère interviennent sur la nutrition des plantes en influençant (i) la disponibilité des nutriments, (ii) la croissance et la morphologie racinaire, (iii) le processus de prélèvement des nutriments (Höflich *et al.*, 1994 ; Patten et Glick, 1996). Les microorganismes de la rhizosphère modifient qualitativement et quantitativement l'exsudation racinaire (Laheurte et Berthelin, 1988 ; Bowen et Rovira, 1991 ; Kent et Triplet, 2002). Ils interviennent au niveau (i) de la perméabilité racinaire, (ii) du métabolisme racinaire et (iii) de l'absorption de certains composés, en modifiant la disponibilité des éléments nutritifs. Ils contribuent ainsi à modifier la disponibilité des éléments minéraux, notamment à altérer les minéraux (Leyval et Berthelin, 1981). Ils utilisent les exsudats racinaires mais en produisent à leur tour et certains microorganismes (e.g. *Pseudomonas putida* et *Azospirillum spp*) sont capables d'induire des signaux provoquant la libération de nutriments par les racines. Ils interviennent également au niveau des phytohormones, substances régulant la croissance des plantes (auxines, gibbérellines, cytoquinines, éthylène et

acide absissique) (Barea *et al.*, 1983 ; Rovira *et al.*, 1983). Certains microorganismes sont même capables de sécréter ces phytohormones (e.g. *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sphingomonas*). Ces interactions entre les plantes et les microorganismes peuvent avoir un effet positif comme négatif.

Le rôle des microorganismes de la rhizosphère dans la mobilité des éléments en traces métalliques est moins bien connu : les bactéries et les champignons peuvent produire des substances acides ou complexantes entraînant la dissolution des minéraux avec des actions chimio-lithotrophes ou chimio-organotrophes (Leyval *et al.*, 1991 ; Watteau et Berthelin, 1994 ; Deneux-Mustin *et al.*, 2001). En revanche, ils sembleraient jouer un rôle important dans la biodégradation de polluants organiques dans la rhizosphère (paragraphe 2.2.2).

Les conditions physico-chimiques de la rhizosphère, et notamment la libération de composés carbonés, contribuent, en partie, à augmenter la densité des populations microbiennes et leurs activités par rapport aux microorganismes présents dans le sol non rhizosphérique (Reilley *et al.*, 1996). La composition des communautés microbiennes de la rhizosphère dépend du type de plante, du type de racine, de l'âge de la plante et du type de sol. Les exsudats racinaires agissent sur les communautés microbiennes par sélection des espèces, par l'augmentation de leur densité et par l'amélioration de leurs activités. Les exsudats racinaires sont spécifiques d'une plante, ainsi, la structure des communautés microbiennes dépend aussi des espèces végétales (Grayston *et al.*, 1998 ; Siciliano *et al.*, 1998 ; Miller *et al.*, 2001). En général, la densité de microorganismes est plus importante dans la rhizosphère (Berthelin *et al.*, 1994) et elle diminue en s'éloignant du rhizoplan (Baudoin *et al.*, 2001 ; Corgié *et al.*, 2003 ).

Paul et Clark (1996) estiment que plus des deux tiers de l'azote fixé dans la biosphère le sont par les bactéries fixatrices d'azote (Rhizobiaceae). Ce mode de fixation de l'azote gazeux (N<sub>2</sub>) est avantageux pour ce type de bactéries car le mécanisme coûte moins d'énergie que la fixation de l'azote moléculaire.

Piccini et Azcon (1987) ont montré que seule la conjonction entre les bactéries solubilisatrices des phosphates et des champignons MA était à même d'augmenter significativement la nutrition phosphatée de la luzerne. La production d'acides indolacétiques et gibbérelliques, de cytokinines et d'éthylène par les microorganismes va modifier la biodisponibilité des nutriments dans la rhizosphère, la croissance et la morphologie végétales. Les sécrétions des microorganismes agissent ainsi sur la racine par rétroaction (Bazin, et Hedges et Messens dans Lynch 1990). Dans les sols pollués par les HAP, l'augmentation de

la biodégradation en présence de plantes serait liée aux communautés microbiennes rhizosphériques (paragraphe 3.2.).

### 3.2.3. Les champignons mycorhiziens à arbuscules

La symbiose mycorhizienne (du grec *mykes* : champignon ; *rhyza* : racine) existe depuis plus de 460 millions d'années. C'est une association mutualiste (Smith et Read, 1997) qui unit un champignon aux racines des végétaux supérieurs. Le champignon hétérotrophe vis-à-vis du carbone, puise ses ressources carbonées dans les exsudats racinaires et en contrepartie, le mycobionte améliore la croissance et la nutrition de la plante.

Parmi les cinq types de symbioses mycorhiziennes existantes, les endomycorhizes à arbuscules et les ectomycorhizes sont les plus répandues.

Les **ectomycorhizes** font intervenir des champignons Ascomycètes ou Basidiomycètes associés à des espèces végétales ligneuses. Un manchon fongique gaine la racine et le mycélium se développe entre les cellules du cortex racinaire. Ce réseau de mycélium, le réseau de Hartig, permet les échanges nutritifs (sucres, acides aminés, minéraux).

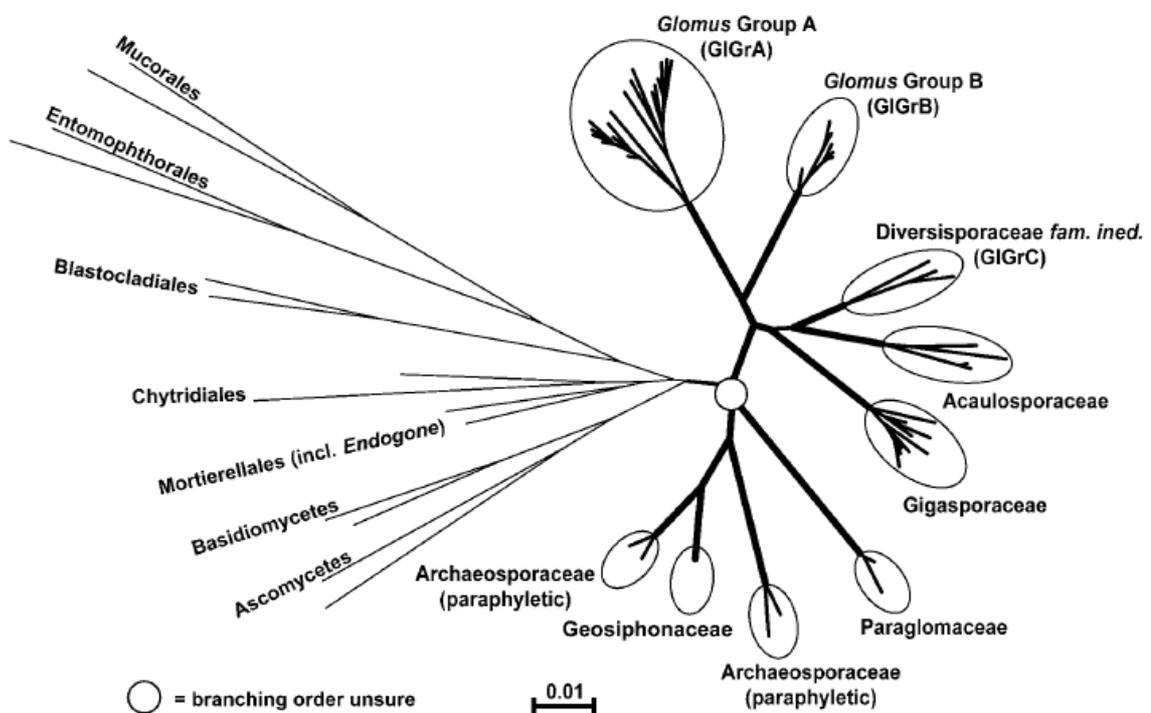
Les **endomycorhizes** ou mycorhizes à arbuscules (MA) colonisent environ 80 % des plantes vasculaires terrestres (Smith et Read, 1997), c'est-à-dire plus de 250 000 espèces (Johansson *et al.*, 2004) : la plupart des Angiospermes, des Gymnospermes, des Bryophytes et des Ptéridophytes (Smith et Read 1997) à l'exception de représentants de certaines familles dont les Brassicacées, les Caryophyllacées, les Urticacées, les Chénopodiacées, les Joncacées et de quelques Cypéracées.

Les travaux de Schüßler *et al.*. (2001a, 2001b, 2002), Schwartzott *et al.* (2001), et Redecker (2000) basés sur l'étude de la sous unité 18S de l'ADNr des champignons MA, et la morphologie des spores ont conduit à séparer les champignons mycorhiziens à arbuscules des zygomycètes et de les classer dans le phylum des Glomeromycota (Schüßler *et al.*, 2001) et dans la classe des Glomeromycètes, elle-même subdivisée en quatre ordres : les Glomerales, les Archaeosporales, les Paraglomerales et les Diversisporales.

Le genre *Glomus* appartient ainsi à la Famille des Glomeraceae et à l'ordre des Glomales. Schwartzott *et al.*, (2001) ont également montré que le genre *Glomus* n'était pas monophylétique et qu'il serait issu de trois groupes (figure 8). Le champignon *Glomus intraradices* fait partie, selon cette classification, du groupe A et du sous-groupe GIGrAb (Schwarzott *et al.*, 2001).

Les champignons MA développent dans le sol un réseau important de filaments microscopiques, les hyphes, qui, lorsqu'ils sont en contact avec une jeune racine forment un

appressorium, s'insinuent entre et dans les cellules corticales où ils se propagent rapidement en différenciant des arbuscules intracellulaires qui sont le siège d'échanges actifs avec les cellules racinaires et des vésicules intercellulaires (à l'exception des genres *Gigaspora* et *Scutellospora*). Des spores sont également différenciées dans le sol et dans les racines. Ce sont des structures unicellulaires, de forme généralement globoïde, à paroi épaisse formée de plusieurs couches de différentes textures, reliées au réseau filamenteux par un hyphe suspenseur. Elles servent d'organes de réserve et de propagation et sont utilisées comme structure de référence pour l'identification des espèces.



**Figure 8 : Arbre phylogénétique des champignons MA (Glomales). Les différentes familles sont indiquées dans les ovales (d'après Schwartzott *et al.*, 2001). Les lignes en gras indiquent des valeurs de bootstrap  $\geq 90\%$ .**

Le contact étroit créé entre la plante et le champignon par le biais du réseau filamenteux constitue le siège d'échanges nutritifs permettant la survie et la croissance des deux partenaires. D'une part, le champignon largement dispersé dans le sol par le biais de son important réseau de filaments, a accès à un volume de sol plus important que le système racinaire lui-même. Les filaments fongiques servent donc de pompe pour diriger vers la racine un supplément d'eau et de sels minéraux auquel celle-ci n'aurait pas normalement accès. D'autre part et en échange, le champignon reçoit de la plante des éléments métabolisés qu'il s'avère incapable de synthétiser lui-même, tels que sucres, acides aminés et métabolites

secondaires. On estime que jusqu'à 20 % du carbone obtenu par l'activité photosynthétique de la plante est utilisé par le champignon (Fitter, 1991 ; Johnson *et al.*, 2002).

Les champignons MA améliorent la **croissance** des plantes ce qui se traduit d'une manière générale par une augmentation de la biomasse végétale produite. Cette stimulation de la croissance peut aussi se traduire par une floraison et une fructification plus précoces et plus abondantes (Wang *et al.*, 1993). L'importance des champignons MA repose sur leur capacité à pourvoir la plante en éléments nutritifs qui diffusent au-delà des zones d'épuisement aux environs de la racine (Marschner, 1995 ; Sieverding, 1991). Les plantes mycorhizées absorbent ainsi plus de phosphore que les plantes non mycorhizées (Siverding, 1991). Marschner (1999) constate que le taux d'absorption du **phosphore** par unité de longueur de la racine colonisée est 2 à 3 fois plus élevé que dans les racines non colonisées. Cette amélioration s'explique en partie par l'exploration d'un plus grand volume de sol par les hyphes externes (Rhodes et Gerdemann, 1975). Les hyphes contribuent ainsi à 70-80 % de l'apport de phosphore pour la plante (Marschner, 1995).

Les plantes mycorhizées ont une meilleure absorption de **l'azote** (Aziza-Chulan et Martin, 1992 ; Khalil *et al.*, 1994) car les hyphes fongiques absorbent l'azote des sources inorganiques d'ammonium (mobilisation des nitrates du sol). L'amélioration de la nutrition azotée est encore plus importante chez les légumineuses qui présentent une double symbiose avec les champignons MA et les bactéries fixatrices d'azote atmosphérique (Linderman, 1992). Les plantes en symbiose avec des champignons MA transfèrent davantage d'assimilats que les plantes non mycorhizées (Wang *et al.*, 1989 ; Eissenstat *et al.*, 1993), ceci afin de répondre à la demande en carbone du champignon MA (Kucey et Paul, 1982).

Les champignons MA interviennent dans l'amélioration de la **structure physique du sol** par le biais de leurs hyphes externes qui contribuent à la formation de micro et macro-agrégats. (Tisdall et Oades, 1979). Selon Barea et Jeffries (1995) cette contribution à la physique du sol serait due d'une part au mycelium qui forme une structure qui maintient, par un simple enchevêtrement, les particules du sol et d'autre part à des mécanismes physico-chimiques incorporant des débris organiques, les racines et les hyphes externes. Ceci crée des conditions favorables pour la formation de micro-agrégats liés en macro-agrégats (Rillig et Mummey, 2006).

Les plantes mycorhizées acquièrent une protection accrue contre les **stress environnementaux** (Sylvia et Williams, 1992) notamment la sécheresse, le froid (Paradis *et al.*, 1995), la salinité élevée (Davis et Young, 1985) et, dans certains cas, la pollution (Leyval

*et al.* 1994; Shetty *et al.* 1995). De plus, la symbiose tend à réduire l'incidence des maladies radicaires et minimise l'effet nocif de certains agents pathogènes (Dehne, 1982; St-Arnaud *et al.*, 1995). Globalement, les plantes mycorhizées ont une croissance et une santé améliorées et acquièrent une protection accrue contre les conditions environnementales défavorables à leur survie.

Certaines souches de champignons MA peuvent même intervenir dans la réduction du des effets toxiques causés par les **métaux lourds** tels que le Cd, le Mn, le Ni, le Pb, le Cu, le Zn, etc. (Leyval *et al.*, 1997 ; Joner et Leyval, 2001b ; Weissenhorm *et al.*, 1995a et 1995b ; Killham et Firestone, 1986) et permettent la réduction de l'absorption de ces métaux par les plantes. D'autres auteurs ont observé une réduction de la concentration de métaux transférés à la plante (zinc et cuivre) sous l'effet de la mycorhization (Schüepp *et al.*, 1987 ; Heggo *et al.*, 1990). Cependant, leurs effets sur l'absorption des métaux lourds dépendent de la concentration initiale des sols en ces ions, du métal et des besoins de la plante hôte mais aussi du type de plante, des champignons et des conditions expérimentales (Heggo *et al.*, 1990 ; Joner et Leyval, 2001b).

### 3.3. INTERACTIONS ENTRE LES MICROORGANISMES

#### 3.3.1. Effets des champignons MA sur les communautés bactériennes

La colonisation des racines par un champignon MA affecte directement et indirectement les communautés bactériennes associées aux racines.

Les champignons MA agissent directement sur (i) les composés riches en carbone formés par la plante et qui sont transportés dans la mycorhizosphère via les hyphes des champignons MA (Andrade *et al.*, 1997), (ii) la compétition pour les nutriments entre les différents protagonistes de la rhizosphère (Ravnskov *et al.*, 1999), (iii) l'exsudation par les champignons MA de composés inhibiteurs ou stimulateurs pour les bactéries (Ames *et al.*, 1984). Les champignons MA agissent indirectement sur (i) la croissance de la plante hôte, (ii) l'exsudation racinaire (Ravnskov *et al.*, 1999) et (iii) la structure du sol (Tisdal et Oades, 1979 ; Andrade *et al.*, 1998).

En affectant les conditions physico-chimiques de la rhizosphère, les champignons MA ont un effet bénéfique sur (i) le nombre de bactéries aérobies présentes dans celle-ci (Meyer et Linderman, 1986) et (ii) la croissance bactérienne (Marschner et Crowley, 1996). Ames *et al.* (1984) ont montré une augmentation de 5.5% des bactéries dans la mycorhizosphère de *Glomus mosseae* et Larsen *et al.*, (1967) une modification de la diversité bactérienne de la rhizosphère par la mycorhization. De la même façon, Secilia et Bagyaraj (1987) ont montré

que la quantité de bactéries dans la rhizosphère de l'herbe de Guinée (*Panicum maximum*) est plus importante chez les plantes colonisées par *Glomus fasciculatum*, *Gigaspora margarita* et *Sclerocystis dussi* que chez les plantes non mycorhizées. Ces auteurs suggèrent que l'augmentation de l'exsudation d'acides aminés par les plantes mycorhizées carencées en phosphore permet une plus forte croissance des bactéries qui consomment ces acides aminés. Andrade *et al.* (1998), à l'aide d'un dispositif à compartiments ont estimé l'effet qualitatif et quantitatif du champignon MA sur les communautés bactériennes de la rhizosphère et sur la stabilité des agrégats du sol.

### **3.3.2. Effets des communautés bactériennes sur les champignons MA**

Les bactéries de la mycorrhizosphère agissent également sur les champignons MA et sur les plantes au niveau (i) de la réceptivité de la racine (Meyer et Linderman, 1986 et Budi *et al.*, 1999 ; Johansson *et al.*, 2004), (ii) de la reconnaissance entre la racine et le champignon, (iii) de la croissance du champignon (Budi *et al.*, 1999), (iv) des modifications chimiques du sol rhizosphérique via leur propre exsudation et (v) de la germination des propagules fongiques (Mosse, 1959 ; Budi *et al.*, 1999 ; Carpenter-Boggs, 1995). Des résultats contradictoires ont parfois été rapportés. Ainsi Mosse (1959) et Daniels et Trappe (1980) ont montré que la germination des spores de champignons MA était améliorée dans un sol stérile ou sur agar en présence de bactéries, tandis que Tommerup (1985) et Ross (1980) ont montré une inhibition de la germination ou de la sporulation dans le cas de sols non stérilisés.

### **3.3.3. Interactions entre champignons MA et bactéries fixatrices d'azote**

La symbiose mycorhizienne et la nodulation ont des points communs au niveau (i) du mode d'infection, (ii) de l'effet sur la nutrition minérale et (iii) de la croissance de la plante (Amora-Lazcano *et al.*, 1998 ; Lum et Hirsch, 2003). La présence d'un champignon MA augmente la nodulation et la fixation de l'azote par les légumineuses (Smith et Read, 1997). L'augmentation de l'absorption du phosphore par le champignon mycorhizien améliore également le fonctionnement de la nitrogénase, enzyme active dans la nodulation, permettant ainsi une fixation d'azote plus importante. En contrepartie, cette absorption accrue d'azote permet un meilleur développement du champignon MA via une meilleure croissance racinaire. Les bactéries fixatrices d'azote peuvent avoir également un rôle positif sur la germination du champignon MA (Mosse, 1959).

Les flavonoïdes et les phénols présents dans les exsudats racinaires sont des signaux qui induisent la croissance des hyphes et stimulent la germination des spores des champignons MA (Gianinazzi-Pearson, 1989). Certains flavonoïdes sont secrétés également en cas de stress en azote et on suppose qu'ils permettent d'attirer les bactéries aux racines (Caetano-Anolles, 1988). Ces flavonoïdes induiraient le gene *nod* des bactéries et seraient à l'origine de la formation des nodosités (Hirsch, 1992).

### 3.4. DEVENIR DES HAP DANS LA RHIZOSPHERE

La rhizosphère est un écosystème complexe mettant en jeu différentes interactions étroites, entre le sol, la plante et les microorganismes qui peuvent conditionner le devenir des polluants et en particulier celui des HAP. Le devenir des HAP dans la rhizosphère est traité dans ce dernier paragraphe montrant que les HAP peuvent être soumis à différents processus : (i) l'absorption, (ii) l'adsorption et (iii) la biodégradation qui peuvent conduire à la diminution de la concentration extractible des HAP.

#### 3.4.1. Dissipation

La concentration extractible en HAP, qui est le plus souvent estimée pour suivre le devenir des HAP dans la rhizosphère, correspond à la résultante de différents processus tels que l'adsorption et la dégradation. On parle alors de dissipation des HAP lorsqu'il y a diminution de la concentration extractible des HAP. Il faut souligner toutefois que certains travaux parlent de biodégradation des HAP en mesurant les quantités extractibles sans avoir montré qu'il s'agit strictement de biodégradation. L'utilisation de composés marqués ( $^{14}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et de conditions expérimentales contrôlées permet de s'intéresser spécifiquement à la biodégradation ou biotransformation.

Un grand nombre de travaux a montré la dissipation des HAP et l'efficacité de la dégradation des HAP dans la rhizosphère (Schwab et Banks, 1994 ; Pradhan *et al.*, 1998 ; Aprill et Sims, 1990 ; Gunther *et al.*, 1996 ; Reilley *et al.*, 1996). Les mécanismes mis en jeu sont multiples : (i) effet direct des enzymes végétales (Gramss et Rudeschko, 1998) et (ii) aération due aux racines, consommation d'eau, (iii) augmentation de l'activité des microorganismes et modification des communautés par la présence de carbone. La réduction de la concentration extractible des HAP contenus dans le sol par les plantes peut atteindre 30 à 44% par rapport à un sol non planté (Reilley *et al.*, 1996). Ces auteurs ont obtenu une augmentation de 32% de la minéralisation du pyrène marqué au  $^{14}\text{C}$  dans le sol rhizosphérique de la fétuque roseau (*Festuca arundinacea* Schreb) par rapport au sol non rhizosphérique au

bout de 60 jours. Avec un apport d'acides organiques, l'augmentation de la minéralisation était de 27%.

Aprill et Sims (1990) ont évalué la persistance de 4 HAP (benzo[a]anthracène, chrysène, benzo[a]pyrène et dibenzo[a, h]anthracène) dans la zone racinaire d'un mélange de 8 plantes de prairie par rapport à des témoins non plantés, après 150 jours de culture. Ils ont ainsi montré que les plantes favorisaient la dégradation des HAP par rapport au sol nu, en particulier après l'ajout d'un milieu nutritif. Chen *et al.*, (2003) ont estimé un taux de minéralisation de 38 % du pyrène et de 30 % du pyrène marqué au  $^{14}\text{C}$  respectivement pour la fétuque roseau (*Festuca arundinacea*) et le panic raide (*Panicum virgatum* L.) et seulement 4,3 % pour le contrôle non planté.

Joner et Leyval (2003b) ont montré, dans deux sols industriels contaminés par des HAP et plantés avec du trèfle et du ray grass, une importante dissipation (25 % après 13 semaines de culture) du contaminant dans la zone intimement liée à la racine (<0,2 mm), l'effet étant absent au-delà de 1 mm. Joner et Leyval (2003b) indiquent que la dissipation des HAP dans la rhizosphère serait la résultante de processus d'adsorption, notamment sur les débris racinaires, et de dégradation, et dépend de la teneur en nutriments dans cette zone.

Des phénomènes de photooxydation, de volatilisation et de lixiviation sont a priori limités dans la rhizosphère (limités aux composés les plus volatils pour la volatilisation, à la surface des sols pour la photooxydation et aux HAP légers les plus solubles ou à l'entraînement particulaire pour la lixiviation) et sont peu documentés. Les microorganismes de la rhizosphère peuvent accélérer le processus de remédiation (Wilson et Jones, 1993 ; Cerniglia, 1997) par volatilisation des HAP ou par augmentation de la production de substances humiques issues des polluants organiques (Cunningham *et al.*, 1996).

### **3.4.2. Adsorption et absorption**

L'absorption des HAP et leur métabolisme dans les plantes ont été étudiés pour des composés tels que le benzo[a]pyrène (Edwards, 1983), le dibenzo [a, h] anthracène ou le fluoranthène (Kolbs et Harms, 2000). Edwards (1988) dans une expérience utilisant une solution nutritive contenant de l'anthracène et du benzo[a]anthracène marqués au  $^{14}\text{C}$  a observé après 30 jours de culture que 54 % du  $^{14}\text{C}$  se trouvait dans les racines, 3,1 % dans les feuilles et 3,4 % dans les tiges. Cependant, cette expérience réalisée en milieu liquide ne reflète pas les conditions rencontrées dans un sol, où l'absorption des contaminants organiques par les plantes est limitée par la disponibilité du composé (Salt *et al.*, 1998). Pour les HAP, l'absorption par les racines et leur translocation vers les parties aériennes est en fait

limitée (Sims et Overcash, 1983 ; Binet *et al.*, 2000a ; Gao et Zhu, 2004), très variable et dépendante de l'espèce végétale concernée et des conditions environnementales. Ainsi, selon Binet *et al.* (2000a) et Gao et Zhu (2004), les teneurs retrouvées dans les racines et dans les parties aériennes représentent moins de 0,5 % de la quantité de HAP apportée dans un sol artificiellement contaminé. La fraction des HAP adsorbée à la surface des racines est plus importante que la fraction absorbée, mais ne représente qu'environ 1 % de la quantité apportée (Binet *et al.*, 2000a).

En général, la concentration des HAP dans les tissus des plantes est en relation avec le degré de pollution dans l'air. Certaines plantes sont capables d'absorber les HAP atmosphériques (Simonich et Hites, 1994) même si ce mécanisme reste rare. Les cuticules des feuilles les plus âgées empêchent la pénétration des polluants organiques tels que les HAP volatiles qui peuvent cependant pénétrer dans les jeunes feuilles (Bukovac *et al.*, 1990). Si le composé est absorbé par la plante, son devenir dépend de divers mécanismes (i) translocation dans les tissus de la plante (Schroll *et al.*, 1994), (ii) volatilisation (Schnoor *et al.*, 1995), (iii) transformation en un composé moins toxique et séquestration dans les tissus de la plante sous forme non disponible.

### **3.4.3. Dégradation par les plantes et rôle des microorganismes de la rhizosphère**

#### **■ Les plantes et les communautés bactériennes**

Les plantes sécrètent de nombreuses enzymes contribuant à la métabolisation des HAP dans la rhizosphère (Wenzel *et al.*, 1999 ; Gramss *et al.*, 1999a). Ces enzymes sont des laccases, des peroxidases, des déhalogénases, des déhydrogénases, des nitroréductases et des nitrilases (Schnoor *et al.*, 1995). Il existe un mécanisme de détoxification par les végétaux (Shimp *et al.*, 1993, Macek *et al.*, 2000), similaire à celui de l'homme (Burken *et al.*, 2000) qui se traduit par l'oxydation du contaminant (phénolases, cytochrome P-450 et peroxydases) (Liste et Alexander, 2000). Sandermann *et al.*, (1994) ont montré que la paroi cellulaire est le principal lieu de détoxification des HAP.

Cependant, la biodégradation par les communautés bactériennes est le principal mécanisme de remédiation des HAP dans la rhizosphère (Wilson et Jones, 1993 ; Schwab et Banks, 1994) et les bactéries constituent le groupe le plus important de microorganismes telluriques responsables de la biodégradation des HAP (Kästner *et al.*, 1994).

Les exsudats racinaires contiennent des analogues des xénobiotiques ce qui réduit le temps d'adaptation des microorganismes pour métaboliser les polluants (Donnelly *et al.*, 1994).

Les enzymes mises en jeu dans la dégradation des HAP (e.g. naphtalène dioxygénase) par les bactéries sont induites par la présence des HAP (Guerin et Boyd, 1995 ; Liste et Alexander, 2000 ; Reilley *et al.*, 1996 ; Siciliano et Germida, 1999). Elles peuvent être transitoires et donc leur activité est plus importante au début de la contamination et moins importante lorsque la contamination est plus ancienne. Baudoin *et al.* (2002) ont également montré que l'âge de la plante était le principal facteur influençant les capacités métaboliques des communautés bactériennes de la rhizosphère du maïs.

Les métabolites secondaires des plantes sont divers (plus de 100 000 composés de faible poids moléculaire ; Singer *et al.*, 2003). Certains de ces composés jouent un rôle dans la remédiation des xenobiotiques car ils stimulent les microorganismes dégradants (Miya et Firestone, 2001). C'est le cas, en particulier, du salicylate qui induit une résistance systémique de la plante (Meyer *et al.*, 1999) et qui est un métabolite intermédiaire de la dégradation du naphtalène par les bactéries. Chen et Aitken (1999) ont montré que le salicylate peut également stimuler la dégradation d'autres HAP (fluoranthène, pyrène, benzo[a]anthracène, chrysène, benzo[a]pyrène). Ce composé augmente l'expression du gène codant la biphenyl dioxygenase chez *Pseudomonas* sp.. Daane *et al.* (2001) ont montré qu'un apport exogène de salicylate dans un sol contaminé par les HAP augmentait la survie et la croissance des bactéries dégradantes et induisait les gènes codant la dégradation des HAP.

Des expériences en pots et dans des dispositifs à compartiments ont permis de montrer des gradients dans la biodégradation des HAP dans la rhizosphère. Ainsi, Joner *et al.* (2001) et Joner et Leyval (2003b) ont montré que la biodégradation de HAP était fonction de la distance aux racines et augmentait lorsque la distance aux racines diminuait. Le dispositif mis au point par Corgié *et al.* (2004) et Corgié (2004) permettait d'isoler, à l'aide d'une membrane de nylon de 37  $\mu\text{m}$ , les racines de ray grass (*Lolium perenne* L.) d'un compartiment contaminant contenant du sable contaminé en phénanthrène (3  $\text{g.Kg}^{-1}$ ) et inoculé avec la microflore d'un sol contaminé. A l'issue des quatre semaines de culture, trois sections de sable ont été prélevées : de 0 à 3 mm des racines, de 3 à 6 mm et de 6 à 9 mm. Ces auteurs ont aussi observé que la dégradation du phénanthrène était plus forte dans la section la plus proche des racines (0-3 mm) (86 %), qu'il existait un gradient de dégradation en s'éloignant des racines (48 % pour la section 3-6 mm et 36 % pour la section 6-9 mm), et que la structure des communautés bactériennes variait aussi avec la distance aux racines.

Thompson *et al.* (1999) ont montré que la proportion de microorganismes capables de dégrader les contaminants organiques augmente après un certain temps de contamination qui dépend de la complexité de la molécule (MacNaughton *et al.*, 1999). La proportion de ces

microorganismes dégradants reste inchangée si l'on apporte au milieu des exsudats racinaires avant que la dégradation ait débuté (Joner *et al.*, 2002). L'apport de nutriments favorise ces microorganismes et en particulier dans un sol pauvre.

#### ■ Les plantes et les champignons mycorhiziens

La présence de champignons mycorhiziens augmente la biodégradation des HAP dans la rhizosphère (Cabello, 1997 ; Binet, *et al.* 2001 ; Joner et Leyval, 2003b). Joner et Leyval (2001a) ont ainsi montré dans un sol artificiellement contaminé en HAP planté avec un mélange de trèfle et de ray grass, que la présence de champignons MA favorise la croissance des deux plantes, la survie du trèfle, et diminue la concentration en chrysène et dibenzo-a,h-anthracène dans la rhizosphère (66 et 42 % de réduction après 16 semaines, contre 56 et 20 % pour les plantes non mycorhizées). Cet effet de l'inoculation par un champignon mycorhizien a aussi été observé dans deux sols industriels contaminés par des teneurs différentes en HAP (Joner *et al.*, 2003a). Binet *et al.* (2000b) n'ont en revanche pas observé d'effet de la mycorhization sur la dissipation de 8 HAP dans la rhizosphère de ray-gras, mais ont montré que les plantes mycorhizées adsorbaient moins de HAP que les plantes non mycorhizées.

Cet effet bénéfique de la mycorhization sur la biodégradation des HAP dans la rhizosphère serait lié au moins en partie à l'amélioration de la croissance et de la nutrition minérale de la plante et à l'amélioration de la tolérance à la toxicité pour des plantes poussant sur des sols contaminés (Leyval et Binet, 1998 ; Olexa *et al.*, 2000 ; Joner et Leyval, 2001a).

Les mécanismes expliquant l'effet des champignons MA sur la dégradation des HAP ne sembleraient pas être liés à une dégradation directe du polluant par ces organismes qui ont une activité saprophytique limitée. En effet, Criquet *et al.* (2000) n'ont pas mis en évidence d'activité enzymatique de type dioxygénase, monooxygénase, et peroxydase accrue en présence de champignon mycorhizien. Cependant, Verdin *et al.* (2006), à partir de cultures de racines transformées permettant de cultiver ces champignons en conditions monoxéniques et en absence de plantes entières, ont montré une augmentation de la dissipation de l'anthracène par *Glomus intraradices* qui serait liée à une accumulation de HAP dans les spores du champignon.

L'effet des champignons MA sur la dégradation des HAP serait plutôt indirect par leur contribution à améliorer les conditions physico-chimiques de la rhizosphère et des organismes. Ils ont également un effet qualitatif sur les communautés microbiennes de la rhizosphère (Joner *et al.*, 2001).

## 4. TRAITEMENTS

### 4.1. REMISE EN ETAT DES SOLS POLLUES ET TECHNIQUES DE DEPOLLUTION

Il existe de nombreuses techniques de dépollution, plus ou moins efficaces selon la nature du contaminant (HAP, métaux, pesticides...), le type de processus utilisé (volatilisation, adsorption...), le niveau et l'âge de la pollution, le type de sol concerné (Riser-Roberts, 1998) (tableau 8). Celles-ci peuvent être réalisées *in situ*, directement sur site, le sol restant en place ou réalisées *ex situ*, sur le site, sur un sol qui a été excavé (traitement « sur site »), voire déplacé du site (traitement « hors site »).

Le choix d'une technique par rapport à une autre est fonction du diagnostic de la pollution, des impacts sur l'environnement et la santé humaine, des usages auxquels le site est destiné et du coût de la dépollution. A titre d'exemple, pour les sols contaminés par les HAP sur les friches d'anciennes usines à gaz, les techniques applicables vont du lavage du sol à son confinement, en passant par les techniques biologiques (tableau 10). Parmi toutes ces techniques de traitements, le choix s'avère difficile mais est extrêmement important pour garantir le succès de la dépollution (Khan *et al.*, 2004). Ces traitements peuvent être combinés les uns avec les autres afin de réduire suffisamment les niveaux de contamination (Reddy *et al.*, 1999).

### 4.2. TRAITEMENTS PHYSICO-CHIMIQUES

Les traitements physico-chimiques constituent la grande majorité des techniques utilisées. Leur principe consiste à trier, transférer et concentrer la pollution vers des points de récupération via des fluides (Sardin, 2000). Ces techniques regroupent des méthodes d'évacuation, de piégeage ou chimiques. Les méthodes thermiques sont des traitements éliminant la majeure partie de la pollution, mais qui s'avèrent modifier les propriétés physico-chimiques et biologiques des sols, voire aboutissent à une matrice dépolluée plutôt qu'à un sol (tableau 9).

**Tableau 8 : Traitements applicables aux sous-produits d'anciennes usines à gaz (d'après Coste et Druelle, 1997).**

	Thermique	Lavage	Venting stripping	Physico-chimique	Biologique	Mise en décharge	Confinement
Goudrons	■						
Gravats pollués	■	■				■	
Matières épurantes	■					■	■
Sols pollués	■	■	■		■	■	■
Eaux de cuves	■			■	■		
Eaux de nappes			■	■	■		

	Traitements	Ex situ	In situ	Contaminants	Avantages	Inconvénients
<b>Méthodes physiques par évacuation de la pollution</b>	Lavage des sols (eau chaude, tensioactifs) sol flushing, sol washing	■	■	Métaux lourds, HAP, PCB, pesticides, VOC, éléments radioactifs	Coûts modérés, utilisable sur les sols perméables, pas de traitements ultérieurs, utilisation ultérieure du sol	Difficulté d'élimination des composés organiques dans les sols argileux et limoneux, altération des propriétés physico-chimique et biologique du sol, souvent long, risque de déplacement de la contamination
	Extraction par vapeur	■		HAP, VOC	Peu coûteux, utilisable en zone insaturée, peu de perturbation du sol, traitement d'un grand volume de sol, stimulation de la biodégradation, élimination de 90% de la pollution, utilisable en zone insaturée	Durée du traitement indéterminée (quelques mois à 2 ans)
	Ventilation/aération		■	VOC, pesticides, produits pétroliers, fuel		Coûteuse, pas utilisable en zone urbaine (vapeurs nocives, inflammables)
	Extraction sous vide (venting)		■	HAP légers	Peu coûteux, élimination de 95-99% de la pollution	Limitation pour les sols sableux
	Séparation physique	■				
<b>Méthodes physiques par piégeage</b>	Stabilisation	■	■	Métaux lourds, composés inorganiques, composés organiques en teneurs limitées	Peu coûteux, pas de traitement ultérieur	Dépollution limitée en profondeur, moins efficace sur les métaux, inefficace sur les pesticides, problème de perméabilité, incertitude de l'évolution à long terme
	Vitrification	■		Métaux lourds, radionucléides, composés inorganiques (immobilisés) et organiques (destruction par pyrolyse)		Coûteux, traitement limité si la pollution est profonde, nécessité de vigilance du traitement des composés organiques et de surveillance à long terme
	Mise en décharge étanche	■				Limitation en fonction des teneurs autorisées
	Confinement par couverture étanche ou encapsulation		■		Coûts modérés	Mobilisation pendant longtemps de grandes surfaces, diminution avec le temps, efficacité pour de faibles contaminations, traitement limité si la pollution est profonde
	Lavage des sols (détergents, solvants organiques)	■	■			
<b>Méthodes chimiques</b>	Réductions des composés aromatiques et des solvants chlorés	■				
	Déhalogénéation de composés chlorés	■				
	Incinération	■		Métaux lourds sauf mercure, VOC, pesticides, produits pétrolier, fuel, composés organiques, hydrocarbures, PCB	Destruction totale des molécules de polluants	
<b>Méthodes thermiques</b>	Désorption thermique	■	■	Métaux lourds sauf mercure, VOC, pesticides, produits pétrolier, fuel, composés organiques, hydrocarbures, PCB	Élimination de 99% de la pollution, insensibilité au niveau de contamination du sol, coût variable	Difficulté d'élimination des composés organiques dans les sols argileux et limoneux, adaptation du traitement pour les métaux
	Vitrification	■	■		Ne nécessitant pas l'excavation, durable, rapide (3-5 tonnes par heure)	Coût élevés, déchargement de gaz toxiques, dépollution limitée en profondeur, interdit toute recolonisation végétale

Tableau 9 : Différents traitements de remédiation physico-chimique de sols contaminés (Sardin, 2000 ; Khan *et al.*, 2004). VOC = volatil organique compound, PCB = polychloro-biphenyls.

#### 4.3. TRAITEMENTS BIOLOGIQUES

##### ■ Bioremédiation

La biorémédiation consiste à utiliser (i) des processus biologiques qui réduisent la mobilité ou transforment les polluants en composés non toxiques, et (ii) des microorganismes, des plantes et des enzymes qui stimulent ces processus (tableau 10).

Les traitements biologiques utilisent le potentiel des microorganismes (les champignons, les bactéries, les actinomycètes et les algues) à dégrader certains types de polluants. Cette biodégradation peut se dérouler sous conditions aérobie ou anaérobie.

Dans le cas des HAP, les techniques de bioremédiation consistent à augmenter leur biodégradation ou biotransformation, en inoculant des microorganismes spécifiques (bioaugmentation) ou en stimulant l'activité de populations microbiennes indigènes (biostimulation) en apportant des nutriments et en ajustant les conditions de milieu (potentiel d'oxydo-réduction, humidité).

Les techniques biologiques sont souvent lentes et incomplètes, il est ainsi conseillé de les associer à d'autres traitements de remédiation. Ces méthodes sont, cependant, les plus respectueuses de la qualité des sols.

**Tableau 10 : Différentes techniques de traitement biologique des sols contaminés (Khan *et al.*, 2004 ; Sardin, 2000)**

Traitements	<i>Ex situ</i>	<i>In situ</i>	Contaminants	Avantages	Inconvénients
Bioventing		■	Toutes substances dégradables en conditions aérobies, produits pétroliers de poids moyens	Peu coûteux, de 6 mois à 2 ans, facile à installer et à combiner	Nécessitant beaucoup de temps pour les composés lourds et peu efficace sur les composés légers, inefficace en cas de forte contamination
Bioréacteur	■		Produits pétroliers, VOC non halogénés, pesticides, PCB	Contrôle de la biodégradation, obtention rapide des conditions optimales (1 à 6 mois), simple	Difficulté d'élimination des composés organiques dans les sols argileux et hétérogènes, coûteux
Biopile	■		Produits hydrogénés peu volatils, produits pétroliers, VOC, pesticides, produits pétroliers légers	Procédé rapide (6 mois à 2 ans), éliminant 95% de la pollution, facile d'utilisation	Nécessitant de grandes surfaces, inefficace en cas de forte contamination surtout en métaux
Landfarming	■		Produits hydrogénés peu volatils, HAP, BTEX	Élimination de 95% de la pollution, coût raisonnable, de 6 mois à 2 ans	Nécessitant de grandes surfaces, nécessitant un pré-traitement préalable, importante surveillance condition du milieu, inefficace en cas de forte concentration, risque de déplacement de la contamination, supportant mal les basses températures
Compostage	■		Hydrocarbures, HAP (2-3 cycles), phénols, solvants, composés azotés, nitrés ou sulfatés	Mise en oeuvre facile, peu coûteux	Excavation nécessaire, technique lente, impact sur l'environnement (polluants volatils)

##### ■ Phytoremédiation

La **phytoremédiation** (du grec "phyto", la plante et du latin "remedium", corriger un méfait) est un ensemble de techniques appliquées au traitement des sols pollués utilisant les plantes et les microorganismes associés pour immobiliser via l'accumulation ou la séquestration, extraire ou transformer (biodégradation, volatilisation) les polluants.

L'association entre les plantes et les microorganismes permet de décontaminer les sols pollués par les HAP mais aussi par les ETM. Toutefois, les mécanismes mis en jeu sont différents (transformation, dégradation, extraction).

La rhizosphère est particulièrement impliquée dans la dégradation des HAP (Newman et Reynolds, 2004). Les plantes adsorbent, accumulent ou volatilisent ces composés, elles augmentent également l'activité microbiologique de la rhizosphère dans le sol. Comme il a été vu précédemment (paragraphe 2.2.2 et 3.2.3), certains champignons, bactéries et plantes utilisent des mécanismes biochimiques leur permettant de dégrader les HAP. Les associations directes (les plantes apportent une source de carbone aux bactéries qui réduisent la phytotoxicité du sol) ou indirectes (le métabolisme végétal stimule les bactéries sans interaction particulière, et cette stimulation contribue à la dégradation du polluant) (Siciliano et Germida, 1997) favorisent la phytoremédiation.

Parmi les techniques regroupées sous le terme générique de **phytoremédiation**, on distingue :

- La **phytostabilisation** : séquestration des polluants (Macek *et al.*, 2000, Pradhan *et al.*, 1998). Cette méthode s'applique dans le cas de sites où la biodisponibilité est réduite,
- La **phytoextraction** : extraction (racine) et accumulation (tiges et feuilles) du contaminant dans les tissus de la plante. Cette méthode utilise les plantes hyperaccumulatrices ou des plantes qui produisent une biomasse importante dans le cadre de pollutions métalliques,
- La **rhizofiltration** : absorption, concentration et précipitation des polluants dans les racines. Cette méthode s'applique spécifiquement à la restauration des eaux de surface et souterraines polluées,
- La **phytodégradation** : simplification des molécules organiques complexes par le métabolisme végétal (e.g. HAP) (Shimp *et al.*, 1993 ; Salt *et al.*, 1998 ; Burken *et al.*, 2000, Macek *et al.*, 2000),
- La **rhizodégradation** : dégradation des polluants (e.g. HAP) par la plante et les microorganismes associés (Cerniglia, 1997 ; Liste et Alexander, 2000 ; Siciliano *et al.*, 1998),
- La **phytovolatilization** : transformation de certains métaux (Zn, Cd...), métalloïdes (arsenic, sélénium...) ou HAP en composés volatils (Sandermann, 1994 ; Schwab et Banks, 1994 ; Davis *et al.*, 1996 ; Macek *et al.*, 2000).

Certaines plantes ont été proposées comme candidates pour la phytoremédiation de sols pollués par les HAP : l'avoine, la fétuque, le lupin, le colza (Liste et Alexander, 2000), la luzerne (Nichols *et al.*, 1997 ; Reilley *et al.*, 1996), le ray-grass (Binet *et al.*, 2000a et 2000b ; Gunther *et al.*, 1996). Ballerini (1998) indique que le système fibreux racinaire des graminées facilite à la fois l'accessibilité des contaminants et le métabolisme microbien et que leur morphologie racinaire (e.g. ray grass) leur confère un avantage dans la dégradation des HAP. Les légumineuses (e.g. luzerne) sont capables de produire des peroxydases extracellulaires qui permettront l'oxydation des HAP (Cavaliere *et al.*, 1983).

L'utilisation de la phytoremédiation pour le traitement de sites pollués par des HAP est encore expérimentale. Les essais réalisés en laboratoire montrent des résultats satisfaisants (Joner *et al.*, 2001; Joner et Leyval, 2003a et 2003b). Les résultats obtenus *in situ* montrent parfois une augmentation de la concentration extractible en HAP, au lieu d'une diminution sans que les mécanismes impliqués soient bien compris (Bidar, 2002).



# PARTIE II

---

## Matériels & Méthodes



## 1. MATERIELS

### 1.1. SITES ET SOLS ETUDIÉS

Ces travaux ont été réalisés sur des sols industriels contaminés principalement par des HAP mais aussi, à un degré moindre, en ETM (tableau 11). Plus précisément, il s'agissait de terres ou de matériaux terreux qui ont été excavés, prélevés et homogénéisés pour le besoin de l'étude.

***NB : Afin de simplifier l'exposé de ce travail, le terme « sol » a été préféré à « terre » bien que les matériaux terreux utilisés ne correspondent plus à des sols encore en place.***

Les sols utilisés ont été collectés sur deux anciens sites industriels situés à Homécourt (Meurthe et Moselle, Nord Est de la France) et à Neuves-Maisons (Meurthe et Moselle, Nord Est de la France). Ces sols ont été mis à la disposition du GISFI (Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles, <http://www.gisfi.prd.fr>) par la société BAIL INDUSTRIE, qui gère les friches industrielles françaises du Groupe ARCELOR.

#### 1.1.1. Site industriel d'Homécourt

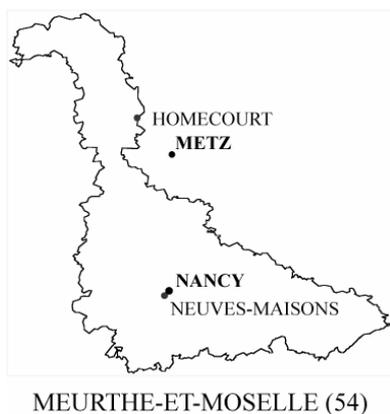
##### 1.1.1.1. Historique

Le site industriel d'Homécourt (figure 9) a vu séjourner deux cokeries successives (documentation Bail industrie).

La première cokerie, mise en service en 1922, comprenait 2 batteries de 70 fours à coke chacune (270 000 tonnes de coke par an). Un gazomètre a été construit en 1934, et les installations ont été remises en état en 1950, pour produire 350 000 tonnes de coke par an.

En 1962, la seconde cokerie a été mise en place sur les fondations de la première. Celle-ci comprenait 4 batteries de 21 fours chacune (450 000 tonnes de coke et 220 millions de m<sup>3</sup> de gaz par an). La cokerie a cessé ses activités en 1981 et a été démantelée entre 1984 et 1985. Elle occupait alors 32 hectares. Le crassier (70 ha) situé à proximité des installations avait pour objectifs le stockage de scories et de laitiers (8 000 000 m<sup>3</sup>), le concassage et le criblage du laitier.

Après la caractérisation des sols (1992-1994), la prospection géologique et l'étude des nappes phréatiques du site ont été réalisées. La réhabilitation du site a débuté par le traitement des terres cyanurées en 1994, suivie, en 1996, de la mise en place de piézomètres et en 1998 de l'imperméabilisation des zones servant de réservoir à goudron.



**Figure 9: Localisation des sites d'Homécourt et de Neuves-Maisons.**

#### *1.1.1.2. Traitement des sols*

Le traitement des sols a été réalisé selon l'ampleur de la pollution en HAP. Pour une pollution supérieure à 5 000 mg.Kg<sup>-1</sup> (18 000 tonnes) les sols ont été dépollués au début 2004 par désorption thermique (entreprise Deep Green, Bruxelles, Belgique) (paragraphe 1.1.1.3). Pour une contamination comprise entre 500 et 5 000 mg.Kg<sup>-1</sup> (12 000 tonnes) les sols ont été dépollués, entre septembre 2001 et novembre 2002, par biopile (entreprise Biogenie, Québec, Canada) (paragraphe 1.1.1.4). Une partie des sols présentant une contamination inférieure à 5000 mg.Kg<sup>-1</sup> a été mise à la disposition du GISFI pour des travaux scientifiques.

#### *1.1.1.3. Traitement par désorption thermique*

Le traitement par désorption thermique (figure 10) a consisté à chauffer les sols contaminés afin de volatiliser les polluants. Les sols ont été préalablement concassés (<50 mm) et injectés dans un four rotatif cylindrique à une température comprise entre 450°C et 550°C. Les sols ont résidé de 8 à 16 min dans le four puis ont été refroidis par injection d'eau dans un mélangeur à vis. La vapeur d'eau et les gaz obtenus ont été filtrés et ces derniers ont été ensuite envoyés en post-combustion où ils ont été incinérés à 1050°C.

#### *1.1.1.4. Traitement par biopile*

Le traitement biologique par biopile (figure 11) a consisté à combiner irrigation et aération des sols pollués pour augmenter la biodégradation des polluants. La biopile était constituée d'une surface étanche sur laquelle a été déposé le sol, permettant de récupérer les eaux de percolation et d'une bâche recouvrant le sol pour éviter l'émission dans l'atmosphère des éléments volatils. Ces-derniers ont été récupérés à l'aide de biofiltres et les eaux de percolation ont été réinjectées dans la biopile. Le système a été enrichi par des nutriments afin d'optimiser les conditions de biodégradation. L'oxygène, la teneur en microorganismes et en nutriments, le pH, l'humidité et la texture du sol ont été régulièrement contrôlés.

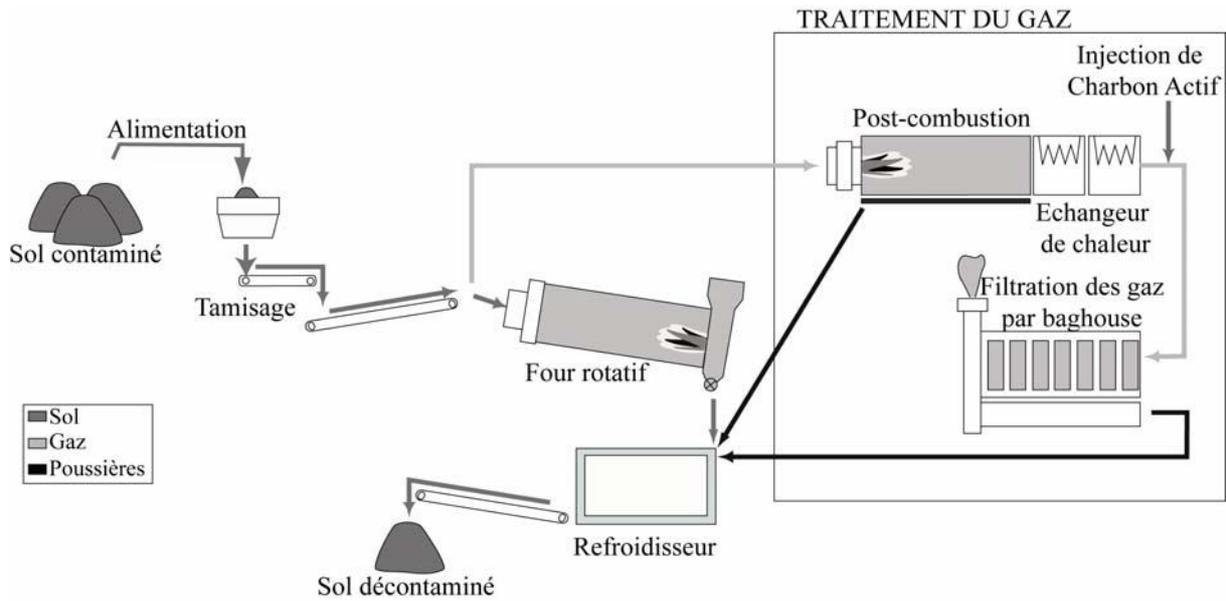


Figure 10: Principe de la désorption thermique (d'après Deep green).

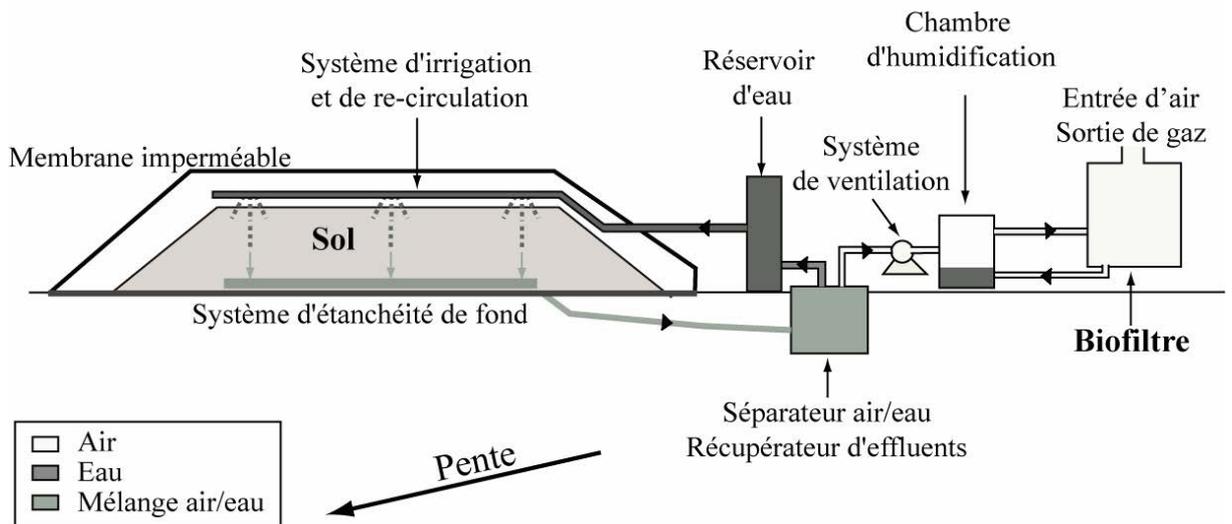


Figure 11 : Principe de la biopile (d'après Biogénie).

### 1.1.2. Site industriel de Neuves-Maisons

#### 1.1.2.1. Historique

Le site industriel de Neuves-Maisons (figure 9) a vu séjourner différentes activités au cours de son histoire (<http://www.axsane.fr>).

Le premier haut fourneau fut construit en 1874 suivi d'un deuxième en 1882 et de deux autres en 1898. L'usine installe en 1902 une aciérie de conversion de type Thomas et en 1903 des laminoirs. Peu après une centrale électrique voit le jour ainsi qu'une aciérie de

conversion (1909). Les sixième et septième hauts fourneaux sont construits en 1913 et 1914. Les deux premiers hauts fourneaux seront arrêtés en 1931 alors que l'usine produisait 8 119 000 tonnes de fonte et 9 700 000 tonnes d'acier (1929).

Après la fermeture de la mine du Val de Fer en 1968, l'aciérie Thomas est transformée en aciérie à oxygène pur. En 1976, l'usine ajoute une chaîne d'agglomération du minerai. En 1984, l'usine de Neuves-Maisons est modifiée par l'utilisation d'un seul haut fourneau, la modification de la coulée continue et l'arrêt de la coulée en lingots, des laminoirs et de la phase de fonte. En 1986 un four électrique est installé. En 2003 l'usine obtient une certification ISO 90001 version 2000 et modernise son système de dépoussiérage et de captation des fumées. Elle produit alors 840 000 tonnes d'acier brut (2004). Une partie du site est encore en activité à l'heure actuelle.

#### *1.1.2.2. Traitement des sols*

Le traitement du sol (46 000 tonnes) a été réalisé entre juin 2004 et janvier 2005 par désorption thermique (entreprise Deep Green, Bruxelles, Belgique).

### **1.1.3. Prélèvements et caractérisation des sols utilisés**

#### *1.1.3.1. Prélèvements des sols*

Les sols traités et non traités issus d'Homécourt ont été prélevés en avril 2004 sur l'ancien site industriel. Le sol a été traité par biopile entre septembre 2001 et novembre 2002 et par désorption thermique début 2004. Après traitement, ils ont été conservés en tas sur le site.

Les sols issus de Neuves-Maisons ont été, quant à eux, prélevés en octobre 2004 sur le site. Le sol non traité a été prélevé sur son site de stockage et le sol traité par désorption thermique le lendemain de sa sortie de l'unité de traitement.

L'ensemble de ces échantillonnages a été réalisé après homogénéisation des sols. Les sols prélevés ont été ensuite séchés à l'air, tamisés à 2 mm puis répartis en lots identiques après quartage.

Après traitement par désorption thermique, le sol pollué de Neuves-Maisons a été transporté et entreposé sur le site d'Homécourt. Des prélèvements successifs de ce sol ont été effectués afin de réaliser des analyses moléculaires des communautés bactériennes présentes et de suivre la recolonisation microbienne de ce sol après traitement (paragraphe 2.2.3.).

*1.1.3.2. Caractérisation des sols utilisés*

Les caractéristiques agronomiques, physico-chimiques et les teneurs en polluants présentés dans le tableau 11 sont des données indicatives. En effet, les sols des sites industriels ont pour particularité une pollution hétérogène générant ainsi des variabilités entre différents lots de sols.

■ **Sols de l'ancien site industriel d'Homécourt**

Les expériences réalisées ont été menées sur le sol non traité ainsi que sur les sols traités par biopile ou par désorption thermique.

Le pH du sol non traité présente un caractère plus basique que ceux des sols traités, qui ont des pH semblables (tableau 11). La texture du sol non traité (limono-sableuse) est différente de celle des sols traités par biopile et par désorption thermique (sablo-limoneuse). Les teneurs en azote total, carbone organique, matière organique et carbone total de ces trois sols sont de même ordre de grandeur. La teneur en phosphore total est plus faible pour le sol non traité que pour les deux autres sols.

La teneur en ETM est plus importante dans le sol traité par biopile, le sol non traité étant le moins contaminé en ETM. La teneur en HAP est importante dans le sol non traité, environ 7 fois plus faible, mais encore importante, dans le sol traité par biopile et 50 fois plus faible dans le sol traité par désorption thermique.

■ **Sols de l'ancien site industriel de Neuves-Maisons**

Les expériences réalisées ont été menées sur le sol non traité ainsi que sur le sol traité par désorption thermique.

Les textures des deux sols sont identiques (sablo-limoneuse) (tableau 11). Le pH du sol traité par désorption thermique est plus basique que celui du sol non traité. Les teneurs en azote total, carbone organique, matière organique et carbone total de ces deux sols sont de même ordre de grandeur. La teneur en phosphore total et en calcaire total est plus faible dans le sol non traité, tandis que les teneurs en carbone organique, azote total et matière organique y sont plus importantes que dans le sol traité.

La teneur en HAP est importante dans le sol non traité (1219 mg.Kg<sup>-1</sup>) mais toutefois plus faible que dans le sol non traité d'Homécourt (environ 3032 mg.Kg<sup>-1</sup>) et elle est 14 fois plus faible dans le sol traité par désorption thermique.

PARTIE II – Matériels & Méthodes

Tableau 11 : Caractéristiques agronomiques, physico-chimiques et teneurs en polluants des sols des anciens sites industriels étudiés (données GISFD).

	SOLS DE L'ANCIENNE COKERIE				
	HOMECOURT			NEUVES MAISONS	
	Sol non traité	Sol traité		Sol non traité	Sol traité désorption thermique
biopile		désorption thermique			
<b>Granulométrie (g.Kg<sup>-1</sup>)</b>					
Argile (<2mm)	99,00	72,00	77,00	126,00	121,00
Limons fins (2-20mm)	151,00	77,00	105,00	164,00	100,00
Limons grossiers (20-50 mm)	91,00	73,00	105,00	97,00	100,00
Sables fins (50-200 mm)	184,00	273,00	220,00	120,00	161,00
Sables grossiers (200-2000 mm)	475,00	505,00	493,00	493,00	518,00
<b>Paramètres agronomiques (g.Kg<sup>-1</sup>)</b>					
pHeau	9,55	8,82	8,78	7,13	8,03
Calcaire total	369,00	201,00	270,00	37,70	53,70
Phosphore P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,09	0,64	0,35	0,29	0,56
Azote total	2,25	1,75	1,34	2,74	0,91
Carbone organique	102,00	95,20	85,60	70,60	61,70
Matière organique	177,00	165,00	148,00	122,00	107,00
C/N	45,40	54,30	63,80	25,80	67,50
<b>Eléments échangeables à l'acétate d'ammonium (g.Kg<sup>-1</sup>)</b>					
Calcium CaO	16,80	11,20	12,20	40,20	38,90
Calcium Ca	12,00	8,01	8,69	28,70	27,80
Magnesium MgO	0,17	1,27	0,23	1,53	0,28
Magnesium Mg	0,10	0,77	0,14	0,92	0,17
Potassium K <sub>2</sub> O	0,35	0,60	0,29	0,66	0,51
Potassium K	0,29	0,50	0,24	0,55	0,43
<b>Métaux totaux (HF) (mg.Kg<sup>-1</sup>)</b>					
Bore	0,63	2,36	1,91	-	3,35
Cuivre	28,40	28,20	49,80	95,50	105,00
Zinc	369,00	1210,00	511,00	2770,00	2690,00
Chrome	56,60	134,00	92,00	372,00	491,00
Nickel	24,90	58,30	43,50	102,00	105,00
Cobalt	10,90	24,70	15,90	27,00	24,10
Plomb	128,00	231,00	246,00	683,00	725,00
Cadmium	6,23	1,35	3,00	2,37	2,14
Mercure	12,80	1,69	0,77	3,38	2,23
Molybdène	1,58	3,35	3,11	11,60	12,40
<b>Métaux extractible à l'EDTA (mg.Kg<sup>-1</sup>)</b>					
Cuivre	6,85	3,08	9,17	8,80	12,10
Manganèse	88,60	31,50	83,20	353,00	165,00
Zinc	24,40	25,00	26,30	294,00	364,00
Fer	60,60	25,50	53,40	83,20	41,10
<b>Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (mg.Kg<sup>-1</sup> MS)</b>					
<i>HAP TOTAUX (16 HAP US-EPA)</i>	<i>3031,96</i>	<i>480,20</i>	<i>57,94</i>	<i>1219,00</i>	<i>100,73</i>
naphtalène	3,45	3,80	11,00	27,00	2,50
acénaphthylène	6,89	<1,50	<1,50	<1,50	<1,50
acénaphène	47,27	1,40	0,56	39,00	1,20
fluorène	133,45	4,50	1,00	34,00	1,60
phénanthrène	415,13	29,00	7,60	120,00	16,00
anthracène	388,54	12,00	2,10	51,00	4,60
fluoranthène	600,78	82,00	9,20	210,00	23,00
pyrène	400,85	62,00	6,20	170,00	15,00
benzo(a)anthracène	249,67	44,00	4,00	105,00	6,70
chrysène	218,15	40,00	4,00	95,00	6,80
benzo(b)fluoranthène	153,64	47,00	4,30	91,00	6,90
benzo(k)fluoranthène	93,56	28,00	2,00	53,00	3,00
benzo(a)pyrène	152,66	51,00	3,00	92,00	4,50
dibenzo(ah)anthracène	15,76	6,50	0,48	10,00	0,63
benzo(ghi)pérylène	66,97	33,00	2,50	58,00	3,90
indénopyrène	85,19	36,00	2,90	64,00	4,40

## 1.2. DISPOSITIF LYSIMETRIQUE EXPERIMENTAL IN SITU

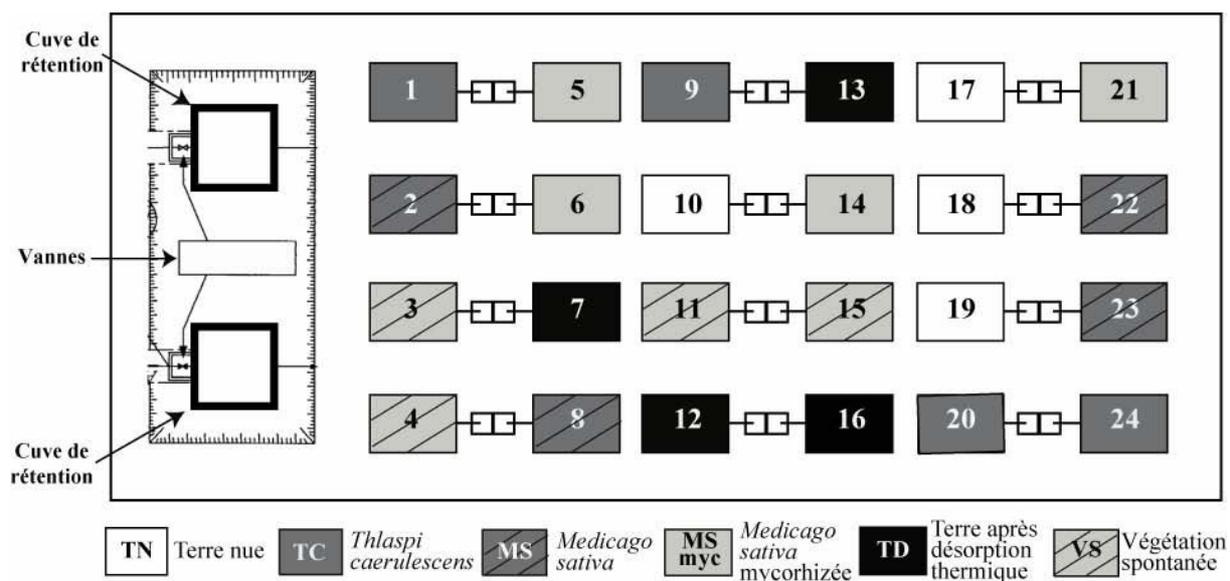
Les parcelles lysimétriques ont été mises en place en septembre 2005 sur le site expérimental du GISFI situé à Homécourt. L'objectif de ce projet est de quantifier le devenir des HAP dans la rhizosphère, in situ, et les conséquences de leur présence dans les systèmes sol-plante. Cinq laboratoires sont impliqués dans ce projet : le Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols (LIMOS), le Laboratoire Sols et Environnement (LSE), le laboratoire d'Ecotoxicité et Santé Environnementale (ESE), le laboratoire Géologie et Gestion des Ressources minérales et énergétique (G2R) et le Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (LSGC).

Ce dispositif expérimental est constitué de 24 parcelles expérimentales contenant deux types de sols : celui non traité issu de l'ancien site industriel de Neuves-Maisons pour 20 parcelles et ce même sol traité par désorption thermique pour 4 parcelles dont la disposition est schématisée dans la figure 12. Ces parcelles mesurent 6 m<sup>2</sup> (3 m x 2 m), et ont une profondeur de 0,5 m. Elles contiennent ainsi environ 3 m<sup>3</sup> de sol. Les eaux de drainage sont récupérées pour chacune des parcelles dans des collecteurs et prélevées régulièrement.

Le dispositif comporte 6 modalités avec 4 répétitions par modalités :

- Sol non traité :
  - non planté
  - planté avec *Thlaspi caerulesens*
  - planté avec *Medicago sativa* L.
  - planté avec *Medicago sativa* L., inoculé par le champignon mycorhizien *Glomus intraradices*
  - non planté, où sera étudié la recolonisation spontanée de la végétation
- Sol traité par désorption thermique, planté avec *Medicago sativa* L., inoculé par le champignon mycorhizien *Glomus intraradices*.

A la mise en place ( $t_0$ ) des parcelles en septembre 2005, un premier prélèvement de sol a été effectué. Il a été prévu de réaliser par ailleurs deux prélèvements de sol par an (automne et printemps) ainsi qu'une récolte de plantes à l'automne. Les eaux de drainage sont, quant à elles, prélevées en fonction des conditions climatiques.



**Figure 12 : Schéma de la répartition des différentes modalités dans le dispositif lysimétrique expérimental *in situ*.**

Dans le cadre de ce projet, le LIMOS a pour objectif spécifique d'étudier les interactions microorganismes-plantes en relation avec le devenir des polluants et notamment :

- (i) d'étudier l'effet des champignons mycorhiziens à arbuscules par l'analyse de la colonisation mycorhizienne des racines, la mesure de la biomasse, la minéralomasse et la teneur en éléments en traces dans les plantes et les sols,
- (ii) d'étudier les communautés microbiennes et leur dynamique au cours du temps,
- (iii) d'étudier, par extraction de l'ADN et de l'ARN des microorganismes du sol, l'expression et l'analyse de la diversité de certains gènes impliqués dans la biodégradation bactérienne et fongique des HAP.

Dans le cadre de ce travail, des analyses moléculaires des premiers prélèvements de sol constituant un état initial du dispositif ont été réalisées.

### 1.3. MATERIEL BIOLOGIQUE

#### 1.3.1. La luzerne

La luzerne cultivée (*Medicago sativa* L., var. vernal) est une plante fourragère herbacée de la Famille des Fabacées (sous-famille de Faboideae, tribu des Trifolieae). C'est une plante vivace à tiges souterraines ramifiées, de 30 à 70 cm de hauteur. Les semences utilisées sont issues de la variété Europe. Elle a fait l'objet de nombreuses études démontrant ses qualités de tolérance aux sols contaminés par des HAP et ses capacités de plante phytoremédiatrice par

phytostabilisation et rhizodégradation (Reilley *et al.*, 1996 ; Ferro *et al.*, 1997a et 1997b ; Pradhan *et al.*, 1998 ; Schwab *et al.*, 1998 ; Kirk *et al.*, 2002).

### 1.3.2. Champignon mycorhizien à arbuscules

*Glomus intraradices* (Schenck et Smith, 1982) est un champignon mycorhizien à arbuscules (MA) du genre *Glomus* (Tulasne et Tulasne, 1845) appartenant au phylum des Glomeromycota (partie I synthèse bibliographique).

Les spores de *Glomus intraradices* sont de couleur blanche à beige pâle pouvant aller jusqu'au jaune-brun. De forme globulaire à subglobulaire, et irrégulière, elles peuvent mesurer de 40 à 140 µm.

Le *Glomus intraradices* (dont la séquence nucléique a 100% d'homologie avec *Glomus intraradices* dont le n° d'accession de GENE BANK est AY635831, SY 16) utilisé lors des expériences en vase de végétation a été isolé d'un sol contaminé en ETM par le professeur H. Bothe (Université de Cologne, Allemagne). L'inoculum a été fourni par C. Grotkass (Institut für Pflanzenkultur, Solkau, Allemagne) sous forme de spores, d'hyphes et de morceaux de racines de maïs colonisées dans un substrat constitué de lave de 2 à 4 mm.

Ce champignon MA a été étudié dans le cadre de cultures sur des sols contaminés en ETM (Joner *et al.*, 2000 ; Chen *et al.*, 2001 ; Leyval *et al.*, 2002). Des études effectuées au sein du LIMOS sur des sols à contamination multiple et notamment en HAP de l'ancien site industriel d'Homécourt (Bidar, 2002 ; Perrin, 2003) ont montré les bénéfices de l'association symbiotique de *Glomus intraradices* au niveau de la survie et de la croissance des plantes mycorhizées.

## 2. METHODES

Dans ce paragraphe sont décrits les différents outils méthodologiques et techniques mis en œuvre au cours de ce travail. Les conditions expérimentales de chacune des expériences seront détaillées dans les chapitres consacrés à la présentation des résultats.

### 2.1. ETUDES AU LABORATOIRE

Les études menées au laboratoire ont comporté des cultures de plantes en pots (paragraphe 1.3.1.) avec des sols contaminés (paragraphe 1.1.), inoculées ou non avec un champignon mycorhizien (paragraphe 1.3.2.).

### 2.1.1. Mise en place des cultures

#### 2.1.1.1. Préparation des sols

Après échantillonnage sur le terrain, les sols ont été séchés à l'air puis tamisés à 2 mm et homogénéisés pour être ensuite conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

#### 2.1.1.2. Désinfection des graines

Les graines ont été désinfectées avant leur mise en germination à partir d'un protocole de désinfection adapté de Vandenkoornhuysen (1998). Elles ont été placées pendant 5 min dans de l'éthanol à 50 %, puis pendant 30 min dans de l'hypochlorite de calcium à 20 %. Elles ont alors été mises en contact durant 10 min avec un anti-fongique, la chloramine T à 2 %, puis placées dans un mélange constitué d'un antibiotique, la streptomycine à 2 %, et de TWEEN 80 à 1 % pendant 10 min. Entre chaque étape, les graines ont été rincées 3 fois dans de l'eau distillée stérile.

#### 2.1.1.3. Germination des graines

Les graines ont été mises à germer à l'obscurité sur un substrat neutre (vermiculite), préalablement stérilisé au four Pasteur (2 heures à 150°C). A l'issue de la germination, les plantules ont été cultivées en conditions contrôlées (24°C durant 16 heures de jour et 20°C durant 8 heures de nuit, 250  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) afin d'uniformiser leurs stades de croissance avant le repiquage.

#### 2.1.1.4. Inoculum mycorhizien

Le champignon mycorhizien à arbuscules utilisé (*Glomus intraradices*) lors des expériences en vase de végétation a été inoculé à raison de 10 g de substrat mycorhizien par kilogramme de sol.

#### 2.1.1.5. Préparation des cultures

Le même protocole de préparation des cultures a été appliqué pour chacune des expériences en vase de végétation. Le sol sec et tamisé a été placé dans le pot recouvert d'un sac plastique puis a été réhydraté pour atteindre 70 % de la capacité de rétention préalablement mesurée. L'inoculum de champignon mycorhizien à arbuscules a été ensuite placé à 1 cm environ de la surface du sol. Pour les modalités non inoculées, le substrat fongique a été remplacé par le même substrat préalablement stérilisé par chaleur sèche (four Pasteur, 2 heures à 150°C). Les plantules préalablement mises à germer durant 7 jours ont été alors transplantées à raison de 10 plantules par pots. La transplantation a été réalisée avec un nombre initial de plantules supérieur au nombre final de plantes souhaitées afin d'anticiper la

mortalité éventuelle, inhérente à la transplantation. Ainsi, au bout d'une semaine, les plantules ayant survécu ont été comptabilisées et le nombre de plantes par pot uniformisé par arrachage des plantes en surnombre.

## 2.1.2. Conduite des cultures

### 2.1.2.1. Conditions de culture

Les cultures ont été menées en chambre de culture, sous conditions contrôlées : air à 80 % d'humidité,  $250 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , 22°C durant 16 heures de jour et 18°C durant 8 heures de nuit.

### 2.1.2.2. Arrosage des cultures

#### ■ Eau distillée

Les plantes ont été arrosées quotidiennement avec de l'eau distillée, de façon à maintenir à 70 % de la capacité de rétention des sols, par ajustement à la pesée.

#### ■ Solution de Hewitt

Une solution nutritive (d'après Hewitt, 1966) a été apportée, pour les modalités fertilisées, 2 fois par semaine, en remplacement de l'arrosage à l'eau distillée. Le tableau 12 résume la composition de la solution nutritive utilisée.

**Tableau 12 : Composition de la solution nutritive apportée aux cultures.**

La solution nutritive a été préparée en apportant 2,5 mL de chacune des 4 solutions mères de macro-nutriments, 0,5 mL de solution mère de micro-nutriments et 0,0081 g de Fe-EDTA pour 1 L de solution finale. Le pH de la solution nutritive a été ajusté à 6,0.

	Formule chimique du produit	SOLUTIONS MERES		SOLUTION NUTRITIVE			
		Quantité apportée g.L <sup>-1</sup>	Concentration apportée g.L <sup>-1</sup>		Concentration apportée mg.L <sup>-1</sup>		
MACRO-NUTRIMENTS	SOLUTION 1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	32,00	N: 22,41		N: 56,03	
		Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	94,50	Ca: 16,04		Ca: 40,10	
	SOLUTION 2	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	7,12	Na: 1,84	P:1,24	Na: 4,60	P: 3,10
	SOLUTION 3	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	70,00	K: 31,41	S: 12,88	K: 78,53	S: 32,20
	SOLUTION 4	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	74,00	Mg: 7,30	S: 9,63	Mg: 18,25	S: 24,08
MICRO-NUTRIMENTS		H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,55	B: 0,27		B: 0,14	
		MnSO <sub>4</sub> , 4H <sub>2</sub> O	1,11	Mn: 0,27	S: 0,01	Mn: 0,14	S: 0,005
		CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,13	Cu: 0,03	S: 0,16	Cu: 0,02	S: 0,08
		ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,58	Zn: 0,13	S: 0,02	Zn: 0,7	S: 0,01
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,02	Mo: 0,01	Na: 0,004	Mo: 0,005	Na: 0,002
		CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,10	Co: 0,02	Cl: 0,03	Co: 0,01	Cl: 0,015
		CoSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,10	Co: 0,02	S: 0,06	Co: 0,01	S: 0,03
ADDITIF		Fe-EDTA	0,0081				

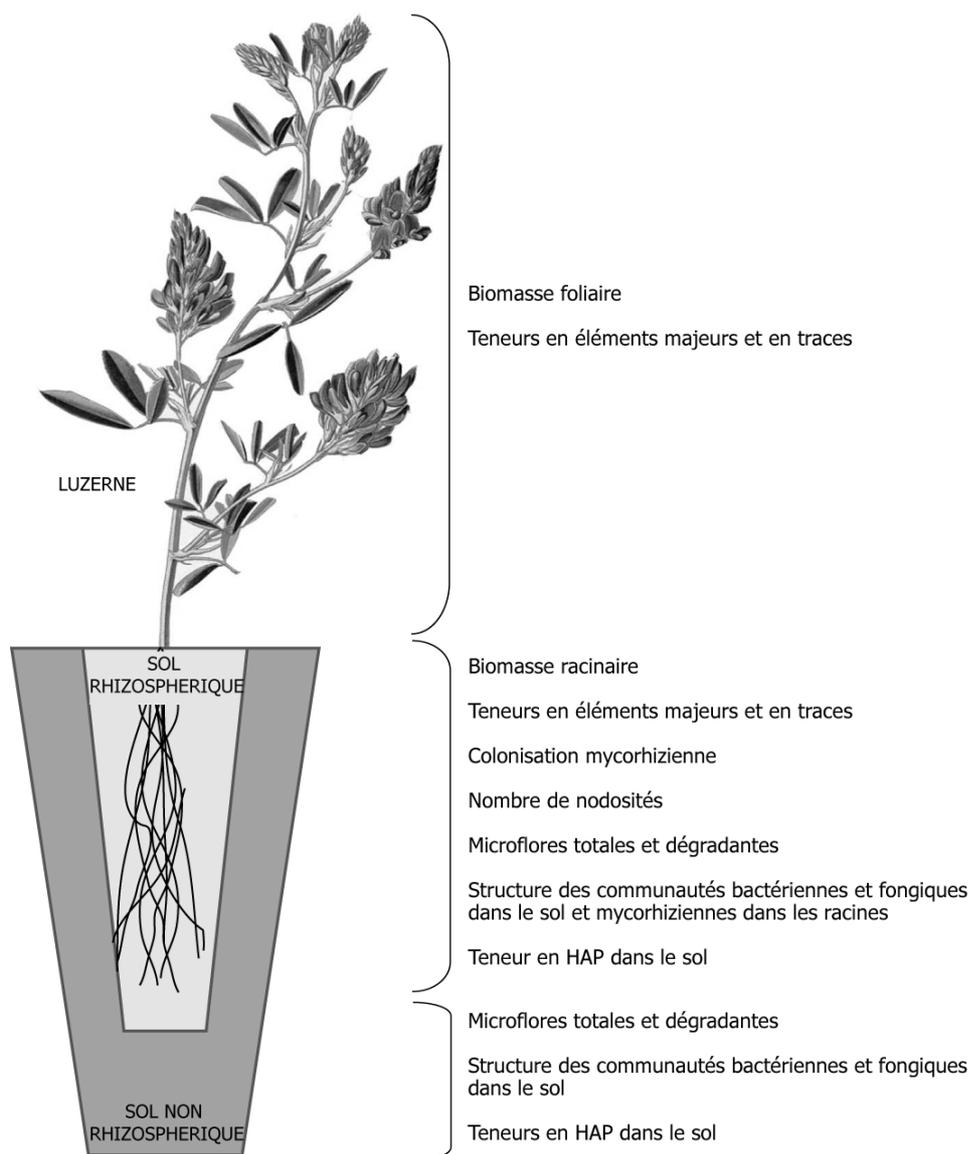
### 2.1.3. Arrêt des cultures

A l'issue de la culture, les vases de végétation ont été démontés. Différentes étapes et manipulations schématisées dans la figure 13 ont été réalisées rapidement et successivement lors du démontage des pots :

- Mesure du taux de survie et pesée de la biomasse fraîche des parties aériennes et des racines (paragraphe 2.3.1.2.),
- Congélation immédiate et conservation d'une partie des racines fraîches à -20°C afin de réaliser ultérieurement des extractions d'ADN (paragraphe 2.3.3.1.),
- Prélèvement de fragments de jeunes racines et conservation dans une solution d'éthanol à 50 % pour analyse des paramètres mycorhiziens (paragraphe 2.3.1.3.) et comptage des nodosités (paragraphe 2.3.1.4.),
- Récupération et pesée du sol rhizosphérique et du sol non rhizosphérique (paragraphe 2.3.1.1.),
- Congélation immédiate et conservation d'une partie des sols rhizosphériques et non rhizosphériques frais à -20°C afin de réaliser ultérieurement des extractions d'ADN (paragraphe 2.3.3.1.),
- Prélèvement de sol rhizosphérique frais pour mise en culture immédiate de la microflore du sol frais dans des plaques de microtitration (paragraphe 2.3.2.).

Par la suite, d'autres analyses ne nécessitant pas un traitement immédiat ont été réalisées :

- Séchage puis pesée de la matière sèche des parties aériennes et des racines (paragraphe 2.3.1.2.),
- Broyage et minéralisation des végétaux secs (paragraphe 2.3.4.1.) pour le dosage des éléments majeurs et en traces présents dans les plantes minéralisées (paragraphe 2.3.4.2.),
- Coloration des fragments de jeunes racines conservées et analyse des paramètres mycorhiziens (paragraphe 2.3.1.3.),
- Dosage des HAP du sol rhizosphérique et du sol non rhizosphérique secs, conservés à 4°C (paragraphe 2.3.4.3.),
- Extraction d'ADN et analyses moléculaires sur le sol et les racines conservés à -20°C (paragraphe 2.3.3.1.),
- Mesure du pH du sol (paragraphe 2.3.4.4.).



**Figure 13 : schéma des analyses effectuées à l'issu des cultures.**

## 2.2. PRELEVEMENTS IN SITU

### 2.2.1. Prélèvements de sol des parcelles expérimentales d'Homécourt

Les études *in situ* ont porté sur l'analyse moléculaire de la microflore des sols issus du dispositif lysimétrique situé à Homécourt (paragraphe 1.2.). Des prélèvements d'échantillons moyens ont été réalisés avant le semis des plantes sur chacune des 24 parcelles du dispositif expérimental. Ces prélèvements moyens consistaient en un mélange de six échantillons issus de chaque parcelle. Afin de tester la représentativité de l'échantillonnage moyen, 6 prélèvements d'une même parcelle ont aussi été analysés, et ce pour chacun des deux sols du dispositif (parcelle n°6 avec du sol de Neuves-Maisons non traité et parcelle n°16 avec du sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique). Les prélèvements de sol ont été réalisés le 08/09/2006.

### **2.2.2. Prélèvements de sol de Neuves-Maisons après traitement par désorption thermique**

Des prélèvements du sol de Neuves-Maisons traités par désorption thermique ont été effectués. Le sol de Neuves-Maisons a été traité par désorption thermique le 10/10/2004 et récupéré le lendemain du traitement pour être stocké sur le site d'Homécourt. Des prélèvements de 100 g de sol en flacons stériles ont été réalisés à différentes dates, sur le site de traitement et après le transport sur le site de stockage (Homécourt). Les échantillons ont été ensuite congelés à -20°C afin d'y analyser les microorganismes recolonisant spontanément le sol traité par désorption thermique.

#### ***Dates de prélèvements :***

*Avant transport : 11/10/2004*

*Après transport : 11/10/2004, 17/06/2005, 12/08/2005, 09/09/2005, 10/11/2005, 07/04/2006, 24/04/2006, 23/04/2007 et 09/07/2007.*

Les échantillons initiaux du 11/10/2004 sont considérés comme les  $t_0$  des analyses. Le prélèvement effectué au bout de huit mois sera noté  $t_8$  a également été utilisé dans le chapitre I partie III afin de le comparer à un échantillon du sol traité par désorption thermique d'Homécourt, également stocké 8 mois sur le terrain.

## **2.3. ANALYSES**

### **2.3.1. Analyses biologiques**

#### *2.3.1.1. Récolte du sol rhizosphérique*

Dans ces expériences, le sol rhizosphérique est considéré comme le sol adhérent aux racines lors du démontage des pots. Ce sol a été récupéré, après culture, par agitation ménagée des racines.

#### *2.3.1.2. Estimation des paramètres de croissance des plantes*

A la récolte, les racines et les tiges ont été séparées et lavées à l'eau distillée. Le nombre de plantes ayant survécu a été compté. La biomasse des parties aériennes et des racines après culture ont été évaluées après séchage à 60°C durant 48h.

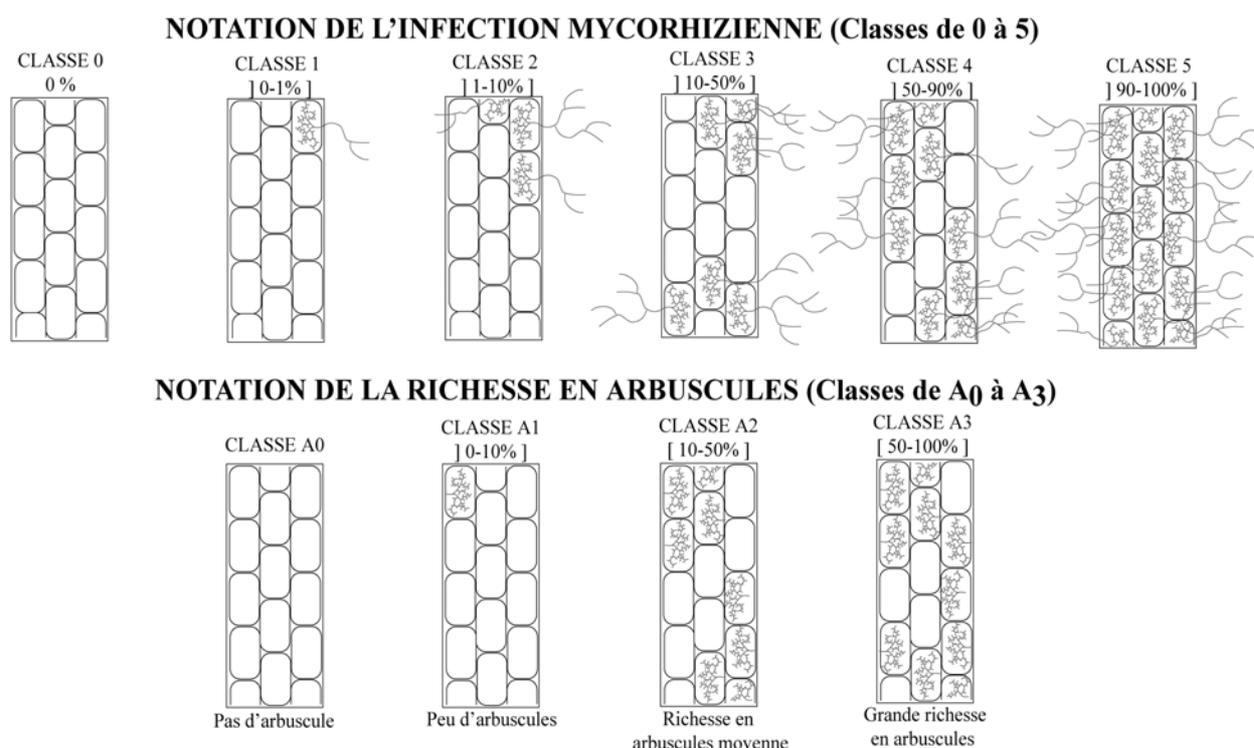
#### *2.3.1.3. Estimation des paramètres mycorhiziens*

La mesure du taux de mycorhization est un moyen de juger, *in situ*, l'état de la mycorhization. Cette méthode se base sur l'observation au microscope optique de fragments de racines, après coloration préalable au bleu Trypan (Koske et Gemma, 1989), afin d'y

déceler la présence de mycélium, d'arbuscules et de vésicules. Trouvelot *et al.*, (1985) ont établi un système de notation afin d'estimer la proportion de cortex racinaire colonisé par le champignon mycorhizien (fréquence et intensité de la mycorhization), basé sur 6 classes ainsi que la présence d'arbuscules (dans la partie mycorhizée et dans le système racinaire), basé sur 4 classes. Ces différentes classes sont décrites dans la figure 14.

#### ■ Coloration des racines :

La coloration au bleu Trypan des racines a suivi le protocole de Koske et Gemma (1989). Des fragments d'un centimètre de racines secondaires fraîches, pris au hasard, ont été préalablement lavés à l'eau distillée puis laissés pendant 12 heures dans une solution d'éthanol à 50 %. Les racines ont été ensuite rincées puis décolorées dans une solution de potasse à 5 %. Après 4-5 rinçages, les fragments racinaires ont été placés pendant 12 heures dans une solution d'acide chlorhydrique à 1 % puis ont été mis dans une solution de bleu Trypan à 0,5 % (0,5 g de bleu Trypan, 50 mL d'HCl à 1 %, 500 mL de glycérol à 98 % et 450 mL d'eau) afin de les colorer. Après une demi-journée, les racines ont été de nouveau rincées puis placées dans une solution de décoloration (50 mL d'HCl à 1 %, 500 mL de glycérol à 98 % et 450 mL d'eau) jusqu'à la préparation des lames. Chaque étape de rinçage a été réalisée à l'aide d'eau distillée.



**Figure 14 : Répartition en classes de la colonisation du cortex racinaire par le champignon mycorhizien et de la présence d'arbuscules (Trouvelot *et al.*, 1985).**

■ **Préparation des lames :**

Les racines ont été placées entre lames et lamelles, avec du glycérol, afin de permettre l'observation au microscope optique (x100). Trente fragments racinaires ont ainsi été préparés pour chaque échantillon, à raison de 10 fragments par lame.

■ **Paramètres d'estimation :**

■ **Equation 1 :** *Fréquence de la mycorhization, F (figure 14).*

$$F\% = 100 \times \left( \frac{N - n_0}{N} \right)$$

N = nombre de fragments observés

$n_0$  = nombre de fragments non mycorhizés

■ **Equation 2:** *Intensité de mycorhization du cortex, M (figure 14).*

$$M\% = \frac{95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1}{N}$$

N = nombre de fragments observés

$n_5$ - $n_1$  = nombre de fragments notés 5 à 1

■ **Equation 3 :** *Teneur en arbuscules de la partie mycorhizée, a (figure 14).*

$$a\% = \frac{100mA_3 + 50mA_2 + 10mA_1}{100}$$

$$mA = (95n_5A + 70n_4A + 30n_3A + 5n_2A + n_1A) \times \frac{F}{M \times (N - n_0)}$$

$mA_3$  à  $mA_1$  = % de fragments mycorhizés, m, affectés par les notes A3 à A1

■ **Equation 4 :** *Teneur en arbuscules du système racinaire, A (figure 14).*

$$A\% = a \times \frac{M}{100}$$

M = intensité de mycorhization du cortex

a = teneur en arbuscules de la partie mycorhizée

2.3.1.4. *Estimation du nombre de nodosités*

Après récolte, les nodosités présentes sur les racines des plantes ont été comptabilisées par observation directe.

**2.3.2. Analyses microbiologiques : dénombrement bactérien en plaques de microtitration**

Le dénombrement des bactéries cultivables et des bactéries dégradant les HAP a été réalisé dans des plaques de microtitration de 96 puits grâce à une méthode statistique de décompte indirect, déterminant le Nombre le Plus Probable (NPP) de cellules initiales présentes en culture. Cette méthode, élaborée à partir de celle de McGrady, est couramment

utilisée pour le dénombrement des microorganismes (Hugues et Plantat, 1983 ; Wrenn et Vernosa, 1996).

#### *2.3.2.1. Préparation de l'inoculum bactérien*

L'inoculum bactérien a été obtenu par agitation par retournement, durant 1 heure, d'1 g d'échantillon de sol placé dans un flacon stérile contenant 10 mL de chlorure de sodium à 0,85 % et 6 g de billes de verre stériles d'1 mm de diamètre. La suspension ainsi obtenue a été ensuite soumise à une série de suspensions-dilutions dans du chlorure de sodium à 0,85 %.

#### *2.3.2.2. Utilisation des plaques de microtitration*

Les plaques de microtitration ont été organisées afin de contenir deux dilutions, de 40 puits chacune, séparées par deux rangées de huit puits ne contenant que le milieu de culture servant ainsi de contrôle.

#### *2.3.2.3. Culture de la microflore totale*

La mise en culture des bactéries hétérotrophes totales (cultivables) a été réalisée en inoculant 25 µl de suspensions d'inoculum bactérien dans 200 µl de milieu Nutrient Both stérile (N.B., DIFCO) à 1 g.L<sup>-1</sup>.

Les plaques de microtitration ont été mises à incuber à 28°C et à l'obscurité. Le dénombrement a été réalisé au bout de 48 heures par mesure de la densité optique de chaque puits à 620 nm (spectrophotomètre CERES UV 900 C, Bio-tek instruments.inc).

#### *2.3.2.4. Culture de la microflore dégradant les HAP*

Une solution de quatre HAP (Binet, 2000a ; Wrenn et Venosa, 1996) a été préalablement réalisée dans un flacon en verre, nettoyé et autoclavé. La solution a été préparée avec un mélange de 9 mg d'anthracène, 9 mg de fluorène, 9 mg de fluoranthène, et 90 mg de phénanthrène dans 8 mL d'hexane. La solubilisation du mélange a été réalisée par agitation à 40°C.

Ce mélange est déposé dans chaque puits de la plaque de microtitration (10 µl). Après évaporation de l'hexane sous une hotte, chaque puits a reçu 200 µl de milieu Bushnell-Haas (B.H., DIFCO) stérile à 3,27 g.L<sup>-1</sup> enrichi en NaCl à 0,85 % (pH ajusté à 7,4). Chacun des 40 puits estensemencé par 25 µl de suspension d'inoculum bactérien.

Les plaques de microtitration sont mises à incuber pendant deux semaines à 28°C et à l'obscurité. Le dénombrement de la microflore dégradant les HAP est réalisé en mesurant l'apparition d'une coloration jaune-brune (la coloration résulte de l'accumulation de produits de l'oxydation partielle des HAP) et par lecture, au bout de ces 15 jours, de la densité optique

de chaque puits à 405 nm et à 620 nm (DO405-DO620) (spectrophotomètre CERES UV 900 C, Bio-tek instruments.inc). Cette lecture a été réalisée sans les couvercles des plaques de microtitration où une condensation s'était déposée (il est possible d'éliminer cette condensation en ouvrant les plaques quelques minutes sous une hotte à flux laminaire). Une lecture à l'œil nu a été également effectuée pour confirmer la lecture du spectrophotomètre qui avait pu être biaisée par la présence éventuelle de bulles d'air au fond des puits des plaques de microtitration.

#### *2.3.2.5. Dénombrement bactérien*

La lecture de la densité optique à 620 nm pour le dénombrement de la microflore dégradante a permis de mettre en évidence la présence de colonies bactériennes lorsque la densité optique mesurée était supérieure ou égale à deux fois la densité optique à 620 nm du milieu de culture exempt d'inoculum. De la même façon, la lecture de la densité optique à 405 nm, correspondant à la coloration jaune-brune du milieu, a permis de mettre en évidence la présence de colonies bactériennes dégradant les HAP. La microflore totale ou celle dégradant les HAP a été quantifiée par la méthode du NPP en utilisant les grilles standard de Mc Grady. Le nombre de bactéries a été ensuite rapporté à un gramme de sol sec.

### **2.3.3. Analyses moléculaires**

La structure des communautés bactériennes et fongiques dans le sol et mycorrhiziennes dans les racines a été analysée. Pour cela, des extractions d'ADN à partir de sol et de racines ont été effectuées. Différentes amorces ont été utilisées pour amplifier par PCR (Polymerase Chain Reaction) chaque groupe de microorganismes. Les fragments d'ADN amplifiés ont été analysés ensuite par électrophorèse à gradient temporel de température (TTGE, Temporal Temperature Gradient Electrophoresis). Les conditions d'extraction de l'ADN, d'amplification et d'électrophorèse par TTGE ont été adaptées à chaque sol et à chaque groupe de microorganismes. Le nombre de copies de gène d'ADN 16S (copie de gène 16S) et de gène de la NDO a été comptabilisé, pour les bactéries Gram + (copie de gène NDO GP) et Gram - (copie de gène NDO GN), par PCR en temps réel. Les différentes étapes de l'analyse moléculaire dans le sol et les racines sont résumées dans la figure 15.

#### *2.3.3.1. Extraction de l'ADN à partir de sol et des racines*

- L'extraction de l'ADN des racines a été réalisée à l'aide du kit d'extraction commercial DNeasy Plant Mini Extraction kit (Qiagen) selon les instructions du fabricant.

▪ L'extraction de l'ADN à partir de sols issus de l'ancien site industriel d'Homécourt a été réalisée selon un protocole développé lors de ce travail. En effet, ces sols, contaminés en HAP et, dans une moindre mesure en ETM, ont posé des problèmes d'extraction de l'ADN et de son amplification. Les kits commerciaux d'extraction et d'autres protocoles d'extraction établis au LIMOS (e.g. Kit MoBio, Corgié *et al.*, 2004) ne se sont pas montrés efficaces pour les sols étudiés ici. La quantité d'ADN obtenue était moins importante et l'amplification réduite, laissant supposer que les extraits d'ADN obtenus n'étaient pas suffisamment purifiés et que le rendement d'extraction n'était pas optimum dans les conditions imposées par des sols contaminés. Le protocole finalement retenu se base sur celui établi par Corgié *et al.* (2004) pour extraire l'ADN total de substrats sableux contaminés en HAP. Ce protocole a été modifié après une série de mises au point par ajout de chlorure de calcium, un agent permettant la floculation des argiles, de cetyltriméthylammonium bromide (CTAB) fixateur des acides organiques et complexant de l'ADN, et de la résine chélatrice, Chelex, captant les ions métalliques. Ce protocole d'extraction a été retenu en raison de la quantité et de la qualité de l'ADN extrait de ces sols contaminés. Les étapes du protocole utilisé sont données dans la figure 16.

▪ L'extraction de l'ADN à partir de sols issus de l'ancien site industriel de Neuves-Maisons a nécessité l'utilisation d'un autre protocole d'extraction (figure 16). En effet, la présence de grande quantité de sulfate de calcium dans ces sols interfère avec l'extraction de l'ADN par la formation d'un précipité colloïdal, lors de l'ajout de la solution d'isopropanol. La quantité d'ADN extraite alors était insuffisante pour pouvoir réaliser l'amplification par PCR. Ainsi, l'extraction de l'ADN à partir de ces sols a été réalisée en deux temps : la première étape de l'extraction est identique au protocole développé pour le sol de l'ancien site industriel d'Homécourt. Ensuite l'extraction a été poursuivie par l'utilisation du kit GENE CLEAN<sup>®</sup> TURBO (MP Biomedicals, LLC), selon les instructions du fabricant.

#### 2.3.3.2. Amplification par PCR de l'ADN ribosomique

##### ▪ Principe

La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR fut décrite en 1985 par K. Mullis. Cette technique permet d'obtenir d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. Elle est basée sur la succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en oeuvre deux amorces oligonucléotidiques qui définissent la séquence à amplifier en la bornant. La synthèse enzymatique contrôlée par des transitions de température répétées de manière cyclique permet l'hybridation et la

déshybridation des brins complémentaires d'ADN. L'amplification obtenue est exponentielle car elle utilise les produits de chaque étape de synthèse pour les étapes suivantes.

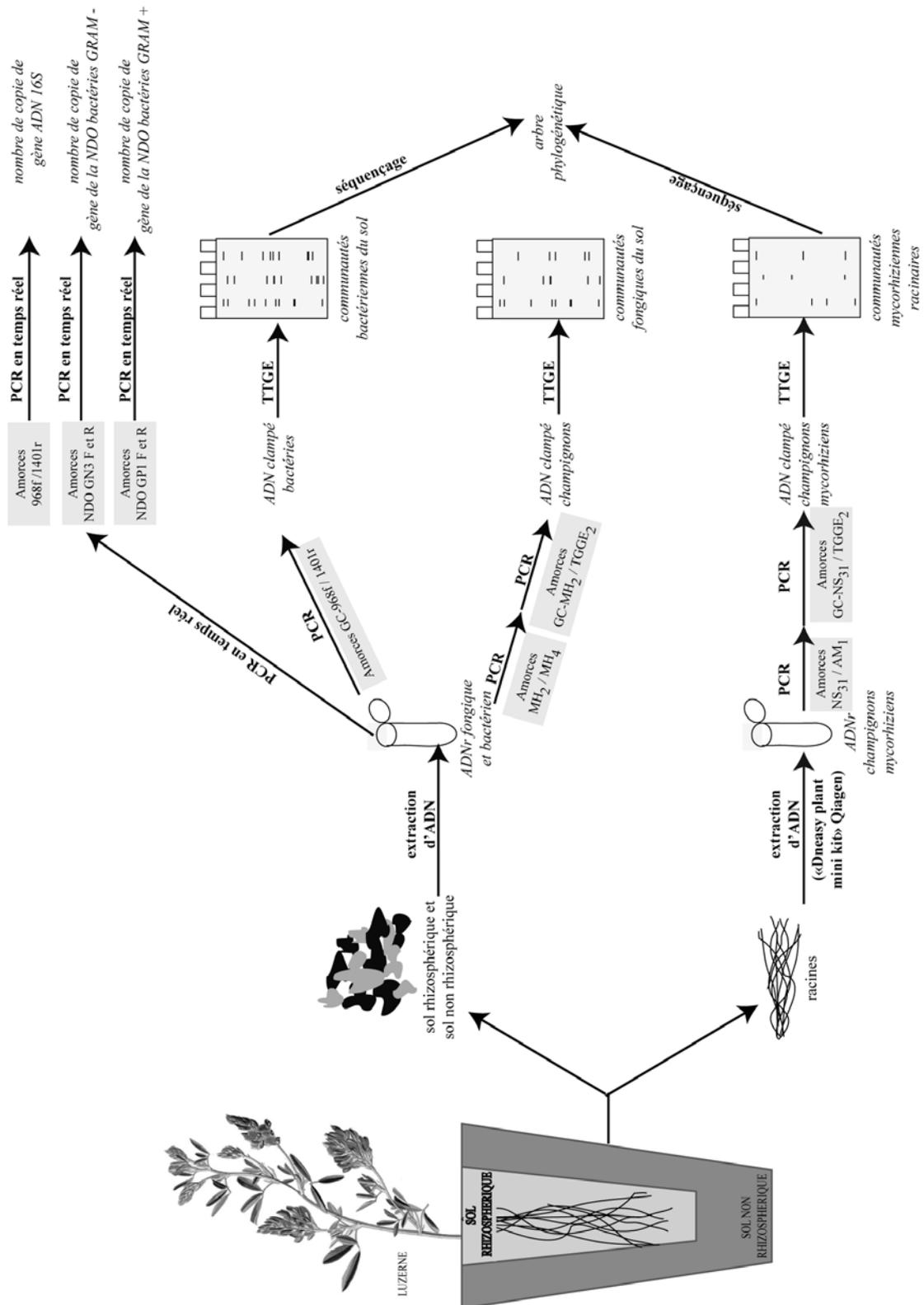


Figure 15 : Représentation schématique des étapes d'analyses moléculaires dans le sol et les racines pour les différents microorganismes (champignons et bactéries).

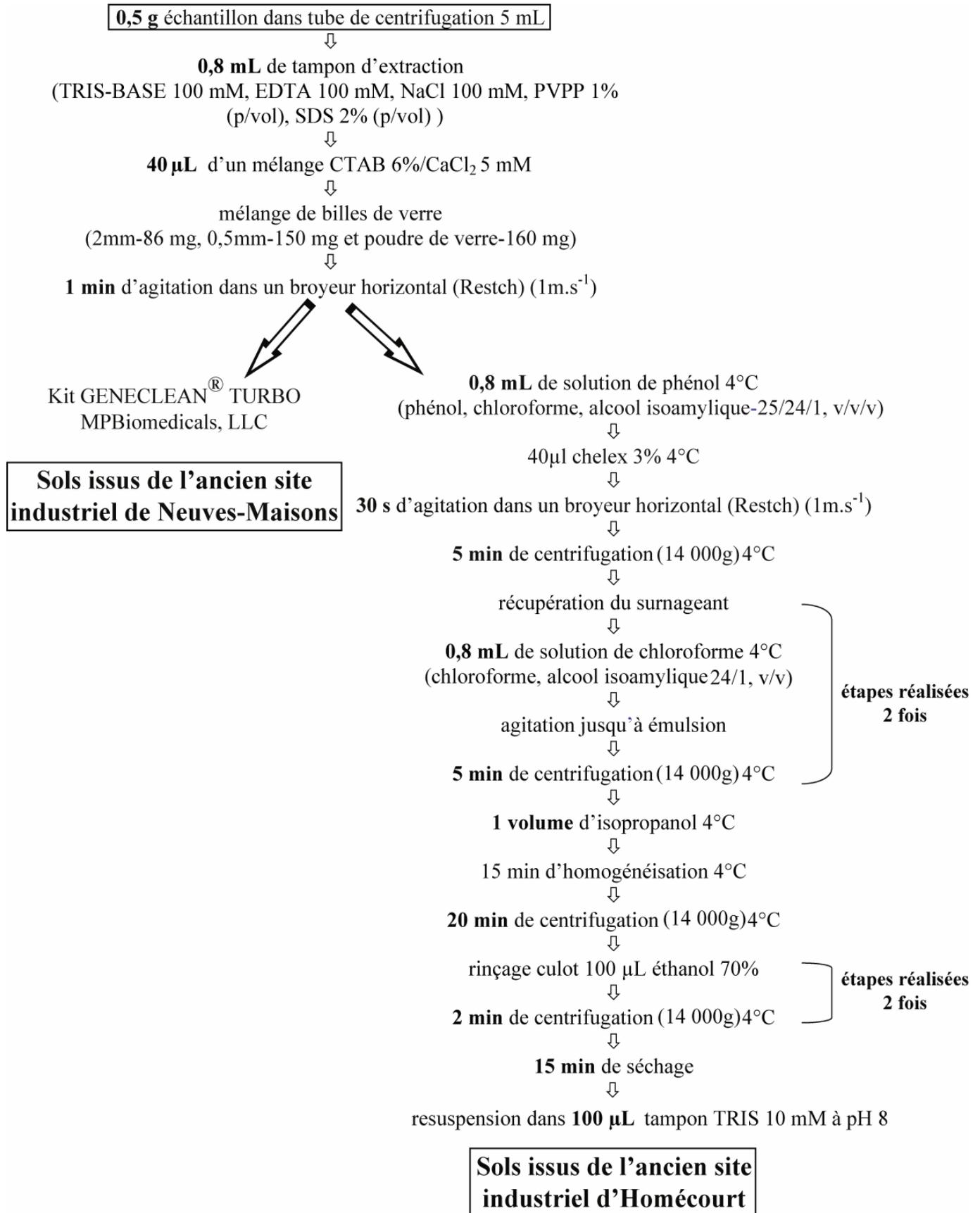


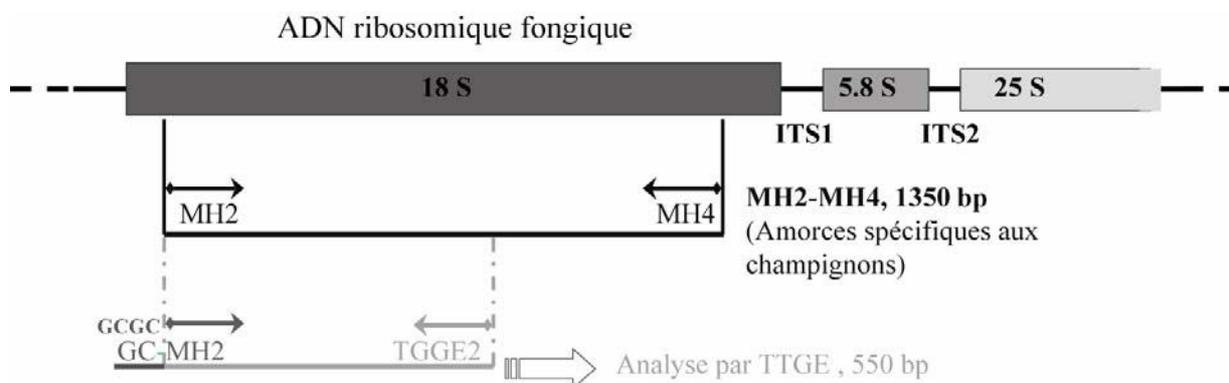
Figure 16 : Protocoles d'extraction de l'ADN à partir du sol adaptés aux sols étudiés.

### ■ Amplification par PCR de l'ensemble des champignons

L'ADN de l'ensemble des champignons présents dans le sol a été analysé par deux PCR successives. La première PCR utilise les amorces MH2 et MH4 (Vandenkoornhuyze et Leyval, 1998) dont les séquences sont décrites dans le tableau 13. Elles forment un fragment d'ADN ribosomique 18S de 1350 bp (figure 17). Une seconde PCR (PCR nichée) a été réalisée, à partir des produits de la première PCR, en utilisant le couple d'amorces GC-MH2 et TGGE2 (tableau 13) qui forment un fragment d'ADN ribosomique 18S de 550 bp (figure 17). Cette dernière PCR a utilisé une amorce additionnée d'une séquence GC-clamp (GC-MH2) pour permettre d'analyser les séquences d'ADN obtenues par TTGE.

**Tableau 13 : Description des amorces utilisées pour l'amplification de l'ensemble des champignons.**

noms des amorces	séquence de l'amorce	taille du fragment amplifié	références
MH2	5'-TTC GAT GGT AGG ATA GAG G-3'	1350 pb	Vandenkoornhuyze et Leyval, 1998
MH4	5'-GTC TCA CTA AGC CAT TC-3'		
GC-MH2	5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GTT CGA TGG TAG GAT AGA GG-3'	550 pb	LIMOS
TTGE2	5'-ATC CTA GAA ACC AAC AAA ATA-3'		



**Figure 17 : Représentation schématique de la localisation des amorces permettant l'amplification de l'ensemble des champignons par PCR nichée.**

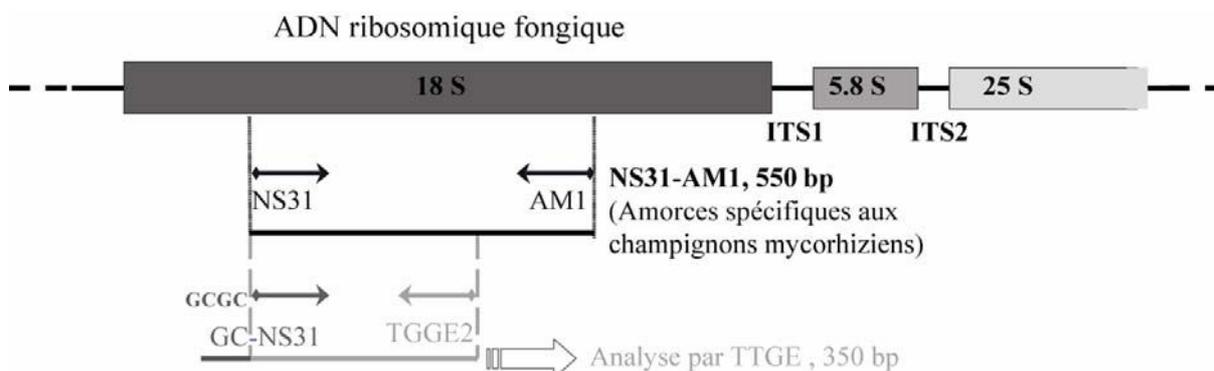
### ■ Amplification par PCR des champignons mycorhiziens

L'ADN des champignons mycorhiziens présents dans les racines a été amplifié par le couple d'amorces AM1, décrit dans la figure 18, spécifique des champignons mycorhiziens (Helgason *et al.*, 1998) et l'amorce universelle des eucaryotes NS31 (tableau 14) (Simon *et al.*, 1992), permettant d'amplifier un fragment de 550 paires de bases de l'ADN ribosomique 18S (figure 18).

Comme pour l'ensemble des champignons, une seconde PCR (PCR nichée) a été réalisée, utilisant les produits de PCR obtenus par le couple d'amorces AM1 et NS31. L'utilisation d'une amorce riche en bases GC, NS31-GC (Kowalchuk *et al.*, 1997) et d'une universelle, TTGE2 (tableau 14 et figure 18) a permis d'analyser l'ADN par TTGE.

**Tableau 14 : Description des amorces utilisées pour l'amplification des champignons mycorrhiziens.**

noms des amorces	séquence de l'amorce	taille du fragment amplifié	références
AM1	5'-GTT TCC AAG GCG CCG AA-3'	550 pb	Helgason <i>et al.</i> , 1998
NS31	5'-TTG GAG GGC AAG TCT GGT GCC-3'		Simon <i>et al.</i> , 1992
GC-NS31	5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GTT GGA GGG CAA GTC TGG TGC C-3'	350 pb	Simon <i>et al.</i> , 1992
TTGE2	5'-ATC CTA GAA ACC AAC AAA ATA-3'		Kowalchuk <i>et al.</i> , 1997 LIMOS



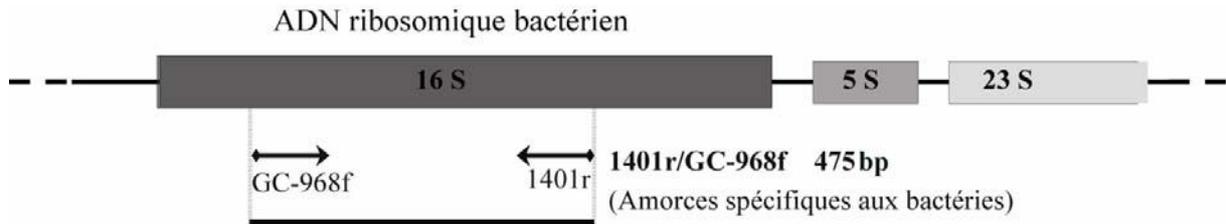
**Figure 18 : Représentation schématique de la localisation des amorces permettant l'amplification des champignons mycorrhiziens par PCR nichée.**

#### ■ Amplification par PCR des bactéries

Les amorces universelles 1401r et 968f ont été utilisées pour amplifier un fragment de la région 16S de l'ADN ribosomique bactérien (Feslke *et al.*, 1998 ; Heuer *et al.*, 1999). Une séquence de 40 pb riche en GC (GC-968f) est ajoutée à l'amorce 968f afin d'éviter la dénaturation complète de la molécule lors de l'utilisation de la TTGE (tableau 15 et figure 19).

**Tableau 15 : Description des amorces utilisées pour l'amplification des bactéries.**

noms des amorces	séquence de l'amorce	taille du fragment amplifié	références
GC-968 f	5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG AAC GCG AAG AAC CTT AC-3'	475 pb	Feslke <i>et al.</i> , 1998
1401 r	5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3'		Heuer <i>et al.</i> , 1999



**Figure 19 : Représentation schématique de la localisation des amorces permettant l'amplification par PCR des bactéries.**

#### ■ Conditions de PCR pour amplifier l'ADNr des champignons

L'amplification par PCR de l'ADN ribosomique 18S a été réalisée pour l'ensemble des champignons et pour les champignons mycorhiziens selon les programmes donnés par le tableau 16. Le milieu réactionnel d'amplification de l'ADN ribosomique 18S (tableau 17) est identique pour l'amplification des champignons totaux et des champignons mycorhiziens et que ce soit pour la première ou pour la seconde PCR (tableau 17).

**Tableau 16 : Composition du milieu réactionnel utilisé pour les PCR de l'ensemble des champignons et des champignons mycorhiziens (Taq polymérase Sigma).**

		concentration initiale	volume de réactif
Tampon 10X	TRIS -HCl	50 mM	5 µL
	KCl	10 mM	
	MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	
dNTP		10 mM	1 µL
Amorce R		20 µM	2 µL
Amorce F		20 µM	2 µL
Taq polymérase		5 U.µL <sup>-1</sup>	0,5 µL
BSA à 3%		3 mg.mL <sup>-1</sup>	2 µL
DMSO à 100%			1,5 µL
Eau stérile			35 µL
Echantillon		qsp	1 µL
<b>Volume réactionnel final</b>			<b>50 µL</b>

Amorces pour les champignons mycorhiziens: AM1/NS31  
GC-NS31/TTGE2

Amorces pour l'ensemble des champignons: MH2/MH4  
GC-MH2/TTGE2

**Tableau 17 : Conditions de PCR pour amplifier (a) l'ensemble des champignons et (b) les champignons mycorrhiziens à arbuscules (Helgason *et al.*, 1998).**

(a) étape	PCR MH2/MH4			PCR GC-MH2/TTGE2		
	cycle	temps	température	cycle	temps	température
<b>dénaturation</b>	1 cycle	2 min	95°C	1 cycle	2 min	95°C
<b>amplification</b>	dénaturation	1 min	94°C	33 cycles	1 min	94°C
	hybridation des amorces	1 min 30 s diminuant de 0,1°C/cycle	48°C		30 s	50°C
	élongation		72°C		30 s	72°C
<b>élongation finale</b>	1 cycle	8 min	72°C	1 cycle	8 min	72°C

(b) étape	PCR AM1/NS31			PCR GC-NS31/TGGE2		
	cycle	temps	température	cycle	temps	température
<b>dénaturation</b>	1 cycle	2 min	95°C	1 cycle	2 min	95°C
<b>amplification</b>	dénaturation	1 min	95°C	33 cycles	1 min	94°C
	hybridation des amorces	40 cycles	62°C		30 s	56°C
	élongation		72°C		30 s	72°C
<b>élongation finale</b>	1 cycle	8 min	72°C	1 cycle	8 min	72°C

#### ■ Conditions de PCR pour amplifier l'ADNr des bactéries

L'amplification par PCR de l'ADN ribosomique 16S a été réalisée selon le programme donné dans le tableau 18. Le milieu réactionnel d'amplification de l'ADN ribosomique 16S est issu du protocole décrit dans Corgié *et al.*, (2004) qui a été adapté ici afin de limiter l'intervention d'éventuels produits inhibiteurs lors de la réaction de PCR (tableau 19). Les modifications apportées ont été l'ajout de sérum d'albumine bovine (BSA) à 3% et du diméthylsulfoxyde à 100% (DMSO).

**Tableau 18 : Conditions de PCR pour amplifier les bactéries.**

étape	cycle	temps	température	
<b>dénaturation</b>	1 cycle	5 min	94°C	
<b>amplification</b>	dénaturation	40 s	94°C	
	hybridation des amorces	38 cycles	30 s	56°C
	élongation		1 min	72°C
<b>élongation finale</b>	1 cycle	5 min	72°C	

**Tableau 19 : Composition du milieu réactionnel utilisé pour les PCR de les bactéries (Taq polymérase FasStart polymérase, Roche).**

	concentration initiale	volume de réactif
Tampon 10X	TRIS -HCl	50 mM
	KCl	10 mM
	(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	5 mM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 µL
dNTP	10 mM	1 µL
Amorce 1401r	100mM	100 µM
Amorce GC 968 f	100mM	100 µM
Taq polymérase	5 U.µL <sup>-1</sup>	0,4 µL
BSA à 3%	3 mg.mL <sup>-1</sup>	2 µL
DMSO 100%		1,5 µL
Eau stérile	qsp	35,1 µL
Echantillon		1 µL
<b>Volume réactionnel final</b>		<b>50 µL</b>

### 2.3.3.3. TTGE

#### ■ Principe

La TTGE est une technique permettant de séparer les brins d'ADN de même taille amplifiés par PCR dans un gel d'acrylamide partiellement dénaturant. Ces fragments double brins se séparent sous l'effet de la température par rupture des liaisons reliant les paires de bases entre elles. Lorsque le double brin est ouvert, il ralentit ou stoppe sa migration, permettant ainsi de distinguer les fragments constitués de séquences nucléotidiques différentes. Afin que les brins d'ADN puissent être séparés par TTGE, mais ne se dénaturent pas complètement, une séquence riche en bases G (guanine) et C (cytosine) est ajoutée à l'extrémité des fragments d'ADN lors de la PCR. Cette séquence sera appelée GC-clamp.

Le gradient de température permettant la séparation des doubles brins d'ADN a été évalué à l'aide du logiciel DNA Melting Profil analysis Software (version 2.0, Biorad).

Les TTGE ont été réalisées à l'aide du système d'électrophorèse Dcode (Universel Mutation Detection System, Biorad).

#### ■ Conditions TTGE pour séparer les fragments d'ADN

Les produits de PCR ont été séparés par un gel d'acrylamide/bisacrylamide partiellement dénaturant dont la composition est présentée dans le tableau 20.

L'urée a été préalablement dissoute dans 20 mL d'eau distillée. Le glycérol, le tampon TAE 1,25x et la solution d'acrylamide/bisacrylamide ont été ensuite ajoutés à l'urée. Après avoir été filtrée à 0,45 µm, la solution a reçu du TEMED et de l'APS afin de catalyser la

réaction de polymérisation (polymérisation à température ambiante durant 1 h). La mise en place du gel dans le système d'électrophorèse a suivi les recommandations du constructeur (Dcode, Universel Mutation Detection System, Biorad). Le gel est ensuite placé dans un bain de tampon TAE 1,25x. Les échantillons d'ADN (5 µL) ont été déposés dans les puits du gel après mélange avec un tampon de charge (tampon de charge 2x : bleu de bromophénol à 0,5 %, cyanol de xylène à 0,5 % et glycérol à 70 %). Les conditions de migration par électrophorèse TTGE de l'ADN ont été différentes selon le type d'échantillon concerné. Ces différentes conditions sont présentées dans le tableau 21.

**Tableau 20 : Composition du gel utilisé en TTGE pour séparer les fragments d'ADN fongique et bactérien.**

produit	ADN fongique		ADN bactérien			
			sols du site industriel d'Homécourt		sols du site industriel de Neuves-Maisons	
	concentration	volume	concentration	volume	concentration	volume
acrylamide/bisacrylamide 30:1 w:v	6%	6 mL	6%	6 mL	6%	6 mL
urée	6 M	10,8 g	8 M	14,4 g	7 M	12,7 g
glycérol	0,2% v/v	0,6 mL	0,2% v/v	0,6 mL	0,2% v/v	0,6 mL
TAE	1,25x	0,75 mL	1,25x	0,75 mL	1,25x	0,75 mL
eau distillée		qsp 30 mL		qsp 30 mL		qsp 30 mL
APS	10%	0,3 mL	10%	0,3 mL	10%	0,3 mL
TEMED		0,03 mL		0,03 mL		0,03 mL

**Tableau 21: Conditions de migration des fragments d'ADN par TTGE.**

	ADN fongique	ADN bactérien	
		sols du site industriel d'Homécourt	sols du site industriel de Neuves-Maisons
température initiale	54,5°C	57°C	57°C
température finale	59°C	63°C	67°C
incrément de température	0,7°C.h <sup>-1</sup>	0,7°C.h <sup>-1</sup>	2°C.h <sup>-1</sup>
voltage	130 V	145 V	100 V

#### 2.3.3.4. Révélation des gels d'agarose et d'acrylamide

##### ■ Révélation des gels d'agarose

La qualité et la quantité de l'ADN obtenu après extraction ou par amplification par PCR ont été analysées par électrophorèse sur gel d'agarose (1 % w/v d'agarose, 120 V). Les gels ainsi obtenus ont été révélés après un bain de 15 min dans du bromure d'éthidium (BET, 0,5 mg.l<sup>-1</sup>, Biorad) et observés sous lumière UV.

### ■ Révélation des gels d'acrylamide

Les gels d'acrylamide obtenus par TTGE réalisées avec l'ADN bactérien ont été révélés au nitrate d'argent car cette méthode s'avère être la plus sensible et la plus appropriée lorsque le nombre de bandes à observer est important. Ils ont été placés durant 30 min. dans de l'acide acétique à 10 %. Après trois rinçages à l'eau distillée, le gel est immergé dans une solution de nitrate d'argent durant 25 min (0,148 % de nitrate d'argent (w/v), 37 % de formaldéhyde (w/v)). Le gel a été rincé deux fois à l'eau distillée puis placé dans une solution de développement constituée de 2,5 % de carbonate de sodium anhydre à 0,1 % (w/v) et de 37 % de formaldéhyde (w/v). Afin d'arrêter la réaction de développement, le gel est placé dans 1,46 % d'éthylène diamine tetraacetic acid (EDTA- $\text{Na}_2$ ,  $2\text{H}_2\text{O}$ ) (w/v). Les gels ainsi obtenus ont pu être observés sous lumière visible.

Les gels d'acrylamide obtenus par TTGE réalisées avec l'ADN fongique ont été révélés par BET (0,5 mg.L<sup>-1</sup>, Biorad) ou par SYBR Gold concentré 10 000 fois (0,1 mL.L<sup>-1</sup>, Biorad).

#### 2.3.3.5. Séquençage

Les bandes majoritaires obtenues par TTGE ont été découpées du gel d'acrylamide et placées dans 100  $\mu\text{L}$  d'eau. Après une série de congélation/décongélation permettant de rompre le maillage d'acrylamide, l'ADN contenu dans ces fragments a été réamplifié selon les mêmes conditions de PCR que celles utilisées avant la réalisation de la TTGE. L'ADN obtenu a ensuite été purifié grâce au kit commercial High Pure<sup>TM</sup> PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostic) selon le protocole fourni par le fabricant. Le séquençage a été réalisé par MWG Biotech (Courtaboeuf, France) à partir de 75 ng d'ADN obtenu par réamplification et les séquences identifiées ont été comparées aux banques de données (National Center for Biotechnology Informatic, NCBI) à l'aide du logiciel BLAST-N (Basic Local Alignment Search Tool).

#### 2.3.3.6. Analyse des gels de TTGE

L'analyse phylogénétique des champignons mycorhiziens a été réalisée par alignement des séquences d'ADN (222 pb) à l'aide du programme d'alignements multiples CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) du logiciel BioEdit Sequence alignment Editor. Le dendrogramme a été construit grâce aux programmes DNADIST-NEIGHBOR-SEQBOOT-CONSENSE du logiciel PHYLIP 3.65 (Felsenstein, 1989). La matrice des distances obtenue a été ensuite utilisée pour réaliser des arbres des plus proches voisins (neighbor-joining trees) qui ont été traités avec le logiciel TREE VIEW.

L'analyse des gels de TTGE a porté sur l'analyse des bandes d'ADN observées sur le gel. Des matrices de présence/absence de bandes ont été réalisées pour chacun des gels à l'aide d'échantillons communs. Ces matrices ont ensuite fait l'objet d'analyses en composantes principales (ACP) (paragraphe 2.3.5.) et de calculs d'indices de diversité (paragraphe 2.3.6.).

#### 2.3.3.7. PCR en temps réel

##### ■ Principe

La PCR en temps réel consiste à mesurer la quantité d'ADN produite à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent. La technique permet ainsi de suivre la cinétique complète de la réaction de polymérisation. De cette façon, il est possible de quantifier de façon absolue la quantité initiale d'ADN cible, ce qui est impossible avec une PCR classique.

La quantification de la cinétique de la réaction de polymérisation se fait par mesure de la fluorescence. Le SYBR Green utilisé ici s'intercale dans la double hélice de l'ADN. La molécule fluoresce en se fixant au double brin d'ADN ( $\lambda_{\text{excitation}}=497$  nm et  $\lambda_{\text{émission}}=521$  nm). La fluorescence disparaît lorsque les brins se dissocient.

Les données de fluorescence peuvent être exprimées en logarithme afin d'identifier facilement la phase exponentielle mesurable, prenant alors une apparence linéaire. Cette partie, appelée « segment quantifiable », permet de calculer la quantité d'ADN initial. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN total est mesurée grâce à un marqueur fluorescent, correspondant au point où la phase linéaire franchi le bruit de fond. L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation (au-dessus du bruit de fond) permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN.

La valeur des cycles de seuil CT (Cycle Threshold) correspond à l'intersection de la phase exponentielle et de la ligne de bruit de fond. Les valeurs de CT des échantillons standard de concentration connue sont déterminées pour construire une droite étalon à chaque cycle de PCR. Les concentrations des échantillons sont déduites de cette droite étalon (Rebrikov et Trofimov, 2005).

##### ■ Conditions de PCR en temps réel pour quantifier l'ADNr 16S et codant la NDO

La quantification de l'ADN bactérien 16S (avec le couple d'amorces 968f et 1401r) a permis d'évaluer le nombre de copies de gène pour l'ensemble des bactéries. D'autre part, l'analyse du gène de la NDO pour les bactéries Gram + (avec le couple d'amorces PAH-RHD NDOGP1R et PAH-RHD NDOGP13F) et pour les bactéries Gram - (avec le couple d'amorces PAH-RHD NDOGN3R et PAH-RHD NDOGN3F), par la technique mise au point

au LIMOS par Aurélie Cebron (Cebron *et al.*, *in press*), a permis d'évaluer le nombre de copies de gène de NDO chez les bactéries. La quantification a nécessité l'utilisation de trois couples d'amorces décrites dans le tableau 22. Le milieu réactionnel utilisé en PCR en temps réel (tableau 23) ainsi que les conditions de quantification (tableau 24) ont suivi le protocole établi par Cébron *et al.*, (soumis).

**Tableau 22 : Description des amorces utilisées pour la quantification par PCR en temps réel.**

noms des amorces	séquence de l'amorce	taille du fragment amplifié	références
968 f	5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3'	433 pb	Feslke <i>et al.</i> , 1998 Heuer <i>et al.</i> , 1999
1401 r	5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3'		
PAH-RHD NDOGN3F	5'-GAG ATG CAT ACC ACG TKG GTT GGA-3'	306 pb	Cebron <i>et al.</i> , soumis
PAH-RHD NDOGN3R	5'-AGC TGT TGT TCG GGA AGA YWG TGC MGT T-3'		
PAH-RHD NDOGP1F	5'-CGG CGC CGA CAA YTT YGT NGG-3'	292 pb	Cebron <i>et al.</i> , soumis
PAH-RHD NDOGP1R	5'-GGG GAA CAC GGT GCC RTG DAT RAA-3'		

**Tableau 23 : Composition du milieu réactionnel utilisé pour les PCR en temps réel.**

	concentration finale	volume de réactif
iQ SYBR GREEN SuperMix (BioRad)	1 X	12,5 µL
Amorce F	0,4 µM	1 µL
Amorce R	0,4 µM	1 µL
T4gp32 (QBiogene)		0,1 µL
BSA	0,9 µg.µL <sup>-1</sup>	0,75 µL
DMSO		0,5 µL
Eau stérile		8,15 µL
Echantillon	1-5 ng.µL <sup>-1</sup>	1 µL
<b>Volume réactionnel final</b>		<b>25 µL</b>

**Tableau 24 : Conditions de quantification de l'ADN par PCR en temps réel.**

étape	cycle	temps	température	capture de la fluorescence
<b>dénaturation</b>	1 cycle	5 min	95°C	—
<b>amplification</b>	dénaturation	30 s	95°C	à la fin de chaque cycle d'élongation (72°C)
	hybridation des amorces	30 s	température d'hybridation	
	élongation	30 s	72°C	
<b>élongation</b>	1 cycle	7 min	72°C	—
<b>analyse de la courbe de fusion des produits de PCR</b>	1 cycle	30 s	95°C	—
	88 cycles	10 s	51°C (+ 0,5°C/ 10 s)	au début de chaque changement de température

Le même programme est utilisé pour tous les couples d'amorces, seule la température d'hybridation varie.

Amorces 968f/1401r (ARNr 16S): 56°C

Amorces NDO GN3F/NDO GN3R (NDO bactéries Gram +): 57°C

Amorces NDO GP1F/NDO GP1R (NDO bactéries Gram -): 54°C

### 2.3.4. Analyses physico-chimiques

#### 2.3.4.1. Minéralisation des végétaux

Les minéralisations des racines et des parties aériennes des plantes ont été effectuées par micro-onde en réacteurs fermés. Les échantillons de végétaux préalablement lavés et séchés ont été broyés dans un mortier en agate à l'aide d'azote liquide. Une prise d'essai (0,1 à 0,5 g de matière sèche) a été minéralisée avec 2 mL de peroxyde d'hydrogène à 35 % et 4 mL d'acide nitrique à 69 % (NORMAPUR). La digestion s'est déroulée par attaque acide à haute température et haute pression (170°C, 5-6 Bars, 600 W, 15min) avec un système de réactions accélérées par micro-ondes (Microwave Accelerated Reaction System, MARS 5, CEM MDS-81D). Des minéralisations à blanc ont été réalisées dans les mêmes conditions et constituent des contrôles. Les solutions obtenues ont été filtrées (papier filtre sans cendre à filtration moyenne, 1392, Sartorius) et ajustées à 25 mL avec de l'eau distillée.

#### 2.3.4.2. Dosage des éléments minéraux

La spectrométrie d'émission à plasma (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry, ICP-AES, JOBIN-YVON JY 238) a été utilisée pour déterminer les éléments majeurs et en traces présents dans les végétaux. Les échantillons ont été solubilisés ou digérés préalablement (paragraphe 2.3.4.1.). Il s'agit d'une spectrométrie d'émission où un plasma d'argon (environ 10 000 °K) échange son énergie avec les atomes présents dans la solution.

Les échantillons ont été analysés par ICP-AES selon les méthodes préconisées par le constructeur. Pour certains échantillons, les analyses, notamment d'éléments en traces comme le plomb, ont été réalisées par spectrométrie d'absorption atomique électrothermique.

#### 2.3.4.3. Analyse des HAP

##### ■ Extraction des HAP

L'extraction des HAP a été réalisée par extraction accélérée par solvant (Accelerated Solvent Extraction, ASE 200, DIONEX) avec 35 mL d'hexane. Trois grammes de sol, préalablement séché et tamisé à 2 mm, ont subi un protocole d'extraction débutant par le chauffage de la cellule dans le four durant 5 min suivi de deux phases d'extraction statique de 5 min chacune. La pression exercée dans les cellules a été fixée à 1500 psi pour un four à 90°C. Le rinçage par du solvant frais a été effectué avec un volume d'hexane de 50 % et la purge a été menée durant 15 min également avec de l'hexane. Cette extraction a été répétée deux fois : la première extrait environ 94 % des HAP et la seconde les 6 % restant.

### ■ Dosage des HAP

Les HAP extraits du sol par ASE ont été analysés par chromatographie gazeuse (gas chromatography, Hewlett-Packard gas chromatography 5890) équipée d'un détecteur par ionisation de flamme (flame ionization detector) (GC-FID). La surface des pics obtenus par chromatographie a été convertie en concentration en HAP à l'aide de calibrages standard.

#### 2.3.4.4. Mesure du pH des sols

Le pH des sols a été déterminé par la mesure potentiométrique d'une solution surnageante obtenue par suspension des sols dans cinq fois leur volume d'eau ultra pure (Norme AFNOR X31-117, NF ISO 10390) (pH-mètre Hydrus 500, Fischerbrand).

### 2.3.5. Analyses statistiques

Des analyses de variance et des comparaisons de moyennes à l'aide du test de Newman-Keuls ( $p=5\%$ ) ont été réalisées à l'aide du logiciel SIGMASTAT (SYSTAT software).

#### ■ Pour les expériences menées avec les sols d'Homécourt :

Une première ANOVA a été réalisée sur trois niveaux c'est-à-dire sur l'ensemble des données (les données pour les trois sols sont réunies). Dans ce cas, les trois niveaux sont le sol, les modalités Inoculée/Non Inoculée (I/NI) et les modalités Fertilisée/Non Fertilisée (F/NF). Une seconde ANOVA a été réalisée, pour chacun des sols, sur deux niveaux. Dans ce cas les deux niveaux sont les modalités I (inoculation) et F (fertilisation).

Pour les teneurs en HAP, les sols non rhizosphériques ont été pris en compte dans les analyses des résultats. Ainsi, une première ANOVA a été réalisée sur trois niveaux (sol, modalités I et F) pour le sol rhizosphérique (SR) et pour le sol non rhizosphérique (SNR). Ensuite, pour chaque sol une seconde ANOVA a été réalisée, sur les paramètres inoculation (I), fertilisation (F) et rhizosphère (R).

L'analyse des profils de TTGE obtenus (nombre de bandes, présence/absence de bandes, similarités entre les profils de bandes) a été réalisée à l'aide du logiciel ADE-4 software (Thioulouse *et al.*, 1997 ; <http://pbil.univ-lyon1.fr/ADE-4/ADE-4F.htm>) par Analyse en Composantes Principales (ACP) (Wikström *et al.*, 1999).

#### ■ Pour les expériences menées avec les sols de Neuves Maisons :

Une première ANOVA a été réalisée sur trois niveaux (sol, modalités I et F) sur l'ensemble des données. Une seconde ANOVA a été réalisée, pour chacun des sols, sur deux niveaux (modalités I et F).

Pour certaines analyses (pH, HAP, microflore), les modalités non plantées (fertilisées et non fertilisées) ont été prises en compte dans les analyses des résultats. Dans ce cas, une première ANOVA a été réalisée sur trois niveaux (sol, modalités I et F) pour chaque sol. Une deuxième ANOVA a été réalisée, pour chacun des sols, sur deux niveaux (modalités I et F) sans tenir compte des modalités non plantées. Une troisième ANOVA a été réalisée pour comparer les modalités non inoculées aux modalités non plantées.

■ **Pour les analyses menées par PCR en temps réel :**

Les analyses par PCR en temps réel ont été réalisées systématiquement par 3 runs de PCR. Outre les répétitions d'analyse pour un même échantillon, certains échantillons étaient en réplicats.

**2.3.6. Indices de diversité**

La richesse totale (en espèces) est représentée par le nombre total d'espèces et la richesse moyenne est représentée par le nombre moyen d'espèces au sein d'un échantillon. L'indice de Shannon-Weaver ( $H'$ ) et l'indice de Simpson ( $\lambda$ ) mesurent, quant à eux, la diversité spécifique des peuplements.

■ **Equation 5: Indice de Shannon-Weaver**

$$H' = - \sum_{j=1}^s \left( \left( \frac{N_i}{N} \right) \times \log_2 \left( \frac{N_i}{N} \right) \right) \quad N_i = \text{nombre d'individus d'une espèce donnée, } i \text{ allant de } 1 \text{ à } S$$

S = nombre total d'espèces ; N = nombre total d'individus

$H'$  est minimal ( $H'=0$ ) si tous les individus du peuplement appartiennent à une seule espèce ou si dans un peuplement, chaque espèce est représentée par un seul individu. Ainsi, l'indice est maximal si tous les individus sont répartis d'une façon équitable dans toutes les espèces présentes. L'indice de Shannon-Weaver varie directement en fonction du nombre d'espèces, les espèces rares ayant moins de poids que les espèces communes (Hill *et al.*, 2003).

■ **Equation 6: Indice de Simpson**

$$\lambda = \sum_{j=1}^s \frac{(N_i(N_i - 1))}{(N(N - 1))} \quad N_i = \text{nombre d'individus d'une espèce donnée, } i \text{ allant de } 1 \text{ à } S$$

S = nombre total d'espèces ; N = nombre total d'individus

L'indice de Simpson renseigne sur la répartition des espèces dans la communauté. Il représente la probabilité que deux individus tirés au hasard dans une population infinie

appartiennent à la même espèce. Cet indice a une valeur de 1 lorsque la diversité est maximale et une valeur de 0 lorsque la diversité est minimale.

Ces différents indices de diversité ont été calculés pour les expériences menées au cours de ce travail.

# PARTIE III

---

## Résultats & Discussions



# PARTIE III

## CHAPITRE I

---

Caractérisation de la pollution et des propriétés biologiques  
des cinq sols étudiés



## INTRODUCTION

Les sols étudiés au cours de ce travail sont issus de deux sites industriels de Lorraine. L'historique de ces deux sites varie à différents niveaux : type d'activité industrielle, durée de celle-ci, date de cessation d'activité (partie II matériels et méthodes). Ainsi, les sols de ces sites ont été exposés à différents types de pollutions organiques et métalliques et dans des proportions variables d'un site à l'autre. Ces sols ont fait l'objet de traitements de décontamination différents afin de réduire, notamment, la teneur en HAP qu'ils contiennent. En effet, le sol du site industriel d'Homécourt a été traité par deux traitements (biopile et désorption thermique) et celui du site industriel de Neuves-Maisons par un seul traitement (désorption thermique) (partie II matériels et méthodes).

Si de nombreuses études présentées dans la littérature ont étudié l'impact de la contamination des sols sur la culture de plantes, peu d'entre elles concernent des sols à pollution multiple et ancienne. Du reste, à notre connaissance, l'impact des traitements de décontamination des sols pollués avec des HAP n'a pas été étudié.

Ainsi ce chapitre propose de présenter les caractéristiques des sols en faisant le point (i) sur les teneurs en polluants métalliques et organiques présents dans les sols d'Homécourt et de Neuves-Maisons, traités ou non et (ii) d'estimer les caractéristiques biologiques de ces sols, notamment leur capacité à supporter la croissance des plantes, et les microorganismes du sol.

Les résultats concernant les teneurs en polluants présentés ici sont issus d'analyses de sols réalisées par l'INRA d'Arras pour le GISFI. Ces analyses n'ayant pas toutes été réalisées en réplicats, les données sont présentées sans écart-type et n'ont pas fait l'objet d'analyses statistiques. Néanmoins, malgré une forte hétérogénéité de la pollution de ces sols, les analyses faites en réplicats (sol non traité d'Homécourt et de Neuves-Maisons) présentaient des valeurs de même ordre. Par exemple, les analyses du chrome total varient de 6% entre les réplicats pour le sol non traité d'Homécourt et de 14% pour le sol non traité de Neuves-Maisons. Dans la seconde partie de ce chapitre, les paramètres biologiques ont été analysés (partie II matériels et méthodes) et ont fait l'objet de répétitions permettant, cette fois, une analyse statistique. Les paramètres mesurés sur chacun des cinq sols ont été la germination des graines de luzerne préalablement désinfectées, le dénombrement en microplaques des bactéries cultivables et dégradant les HAP, l'analyse par PCR en temps réel de l'ensemble des bactéries, avec la mesure du nombre de copies de gène 16S, et des bactéries dégradant les HAP, avec la mesure du nombre de copies de gène pour la naphthalène dioxygénase.

## 1. TENEURS EN POLLUANTS

### 1.1. HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES

La comparaison de la répartition des HAP totaux dans les deux sites industriels (tableau 11, Partie II matériels et méthodes et figure 20) montre globalement une prédominance des HAP à 4 cycles benzéniques. Cependant le sol d'Homécourt a davantage de composés à 3 cycles que le sol de Neuves-Maisons, où les HAP à 5 cycles sont plus nombreux.

Les trois sols d'Homécourt se distinguent selon la répartition des HAP (tableau 11, Partie II matériels et méthodes et figure 20). Le sol non traité contenant environ 3000 mg.Kg<sup>-1</sup> de HAP est constitué de 35 % d'HAP à 3 cycles benzéniques (acénaphthylène, acénaphène, fluorène, phénanthrène, anthracène), 51 % de composés à 4 cycles (fluoranthène, pyrène, benzo[a]anthracène, chrysène) et 14 % de composés à 5 cycles (benzo [b, k] fluoranthène, benzo[a]pyrène) (tableau 11 Partie II matériels et méthodes et figure 20). Le sol traité par biopile contient 480 mg.Kg<sup>-1</sup> (6 fois moins que le sol non traité) avec 12 % d'HAP à 3 cycles, 57 % de composés à 4 cycles et 31 % de HAP à 5 cycles. Lors de ce traitement, les microorganismes se sont attaqués préférentiellement aux HAP les plus facilement dégradables c'est-à-dire les plus légers, conduisant à une réduction du pourcentage des composés à 3 cycles et à un enrichissement relatif aux composés à 5 cycles.

Pour le sol traité par désorption thermique, qui contient 58 mg.Kg<sup>-1</sup> (près de 50 fois moins que le sol non traité), les HAP à 3 cycles représentent 26 %, ceux à 4 cycles 53 % et ceux à 5 cycles 21 % (tableau 11, Partie II matériels et méthodes et figure 20). La réduction des teneurs en HAP par la désorption thermique permet aussi la réduction proportionnelle des HAP les plus légers qui sont également les plus facilement volatilisables, enrichissant alors le sol en HAP à 5 cycles, mais cette évolution est proportionnellement moins marquée qu'avec le traitement par biopile.

Les deux sols de Neuves-Maisons ont des répartitions en HAP similaires : les HAP à 3 cycles représentent de 23 à 26 %, ceux à 4 cycles 55 à 58 % et ceux à 5 cycles 22 à 16 % pour le sol non traité et pour le sol traité par désorption thermique (tableau 11, Partie II matériels et méthodes et figure 20). Toutefois les concentrations en HAP totaux sont 12 fois moins importantes dans le sol traité par désorption thermique (101 mg.Kg<sup>-1</sup>) que dans le sol non traité (1219 mg.Kg<sup>-1</sup>) (tableau 11 Partie II matériels et méthodes et figure 20). Dans ce cas, la désorption thermique modifie peu le pourcentage relatif des différents composés. La réduction de la quantité de HAP totaux et la répartition de ceux-ci ont également été analysés

sur des lots de sols identiques par Biache *et al.* (soumis) qui observent que la réduction des HAP les plus légers s'accompagne d'une réduction des HAP oxygénés et sulfurés.

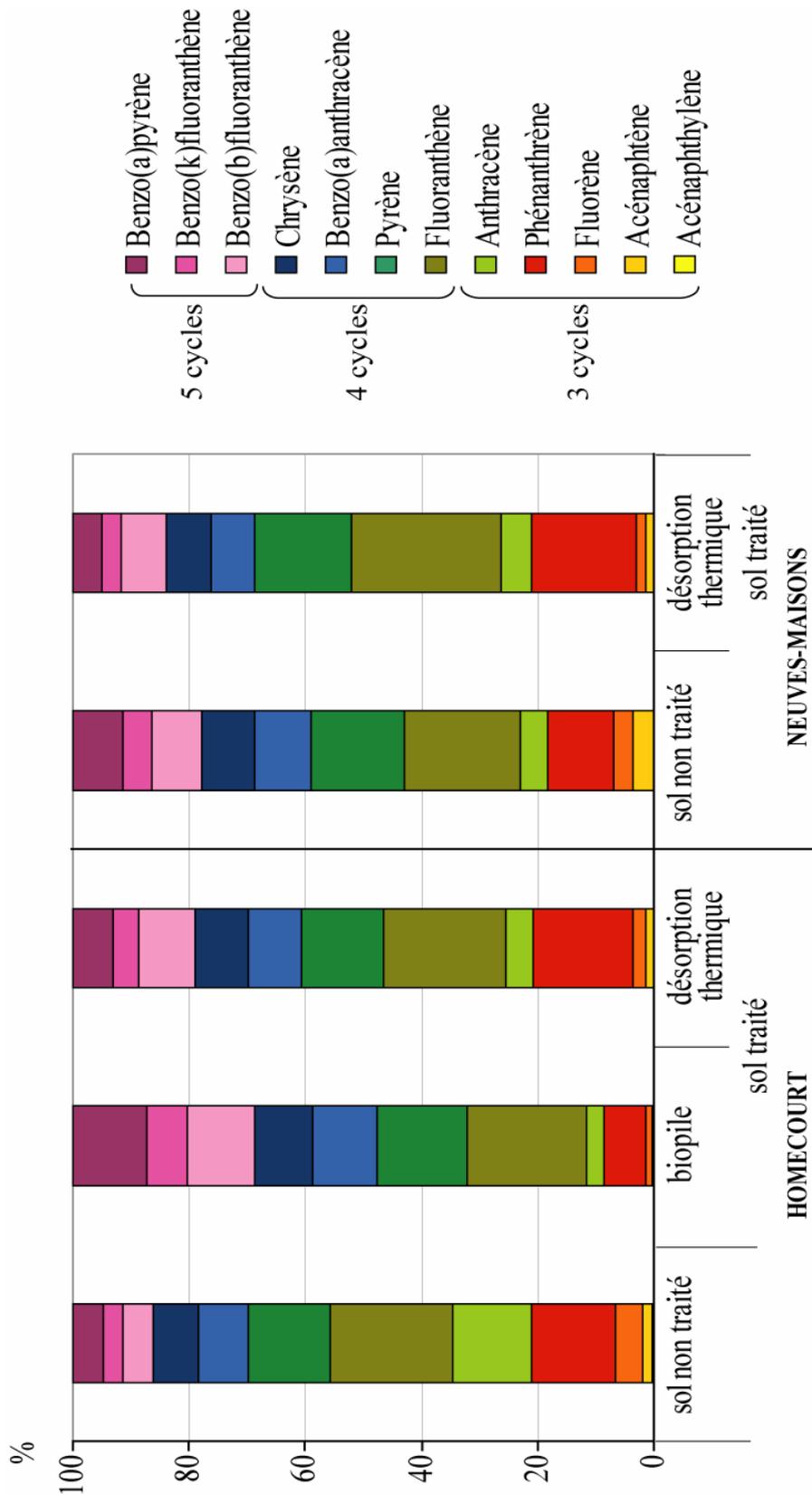


Figure 20: Répartition des HAP dans le sol initial d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique et dans le sol initial de Neuves-maisons non traité et traité par désorption thermique (Analyses INRA Arras, données GISFD).

## 1.2. ELEMENTS EN TRACE METALLIQUES

Les caractéristiques agronomiques des sols des sites industriels d'Homécourt et de Neuves-Maisons ont été discutées dans la partie II matériels et méthodes. Rappelons que, malgré des variations de pH d'un sol à l'autre, les valeurs sont soit proches de la neutralité (sol non traité de Neuves-Maisons) soit basiques. Les sols traités par biopile d'Homécourt et par désorption thermique d'Homécourt et de Neuves-Maisons sont légèrement basiques tandis que le sol non traité d'Homécourt a un pH plus basique.

Seule une partie des analyses de métaux totaux et des métaux échangeables à l'EDTA réalisées pour le GISFI sont présentées ici (tableau 11, Partie II matériels et méthodes). Elles concernent notamment les éléments en traces métalliques présentant des concentrations anormalement élevées, qui pour certains atteignent voire dépassent la VCI à usage sensible (Partie I synthèse bibliographique), c'est-à-dire Cd, Hg, Pb, Zn et As.

Au niveau des trois sols d'Homécourt les teneurs en **cadmium** total (figure 21) varient de 3 à 6 mg.kg<sup>-1</sup>, le sol non traité étant le plus contaminé, mais sa teneur en Cd ne dépasse cependant pas la valeur de VCI à usage sensible fixée à 20 mg.kg<sup>-1</sup>. L'absence de répétitions des analyses ainsi que la forte hétérogénéité de la pollution des sols pourraient être à l'origine de cette variabilité. La teneur en cadmium dans le sol de Neuves-Maisons est plus faible que dans le sol non traité d'Homécourt. Néanmoins, ces valeurs sont similaires dans le sol non traité et le sol traité par désorption thermique.

La contamination en **chrome** des deux sites industriels n'est pas du même ordre de grandeur et est nettement plus importante à Neuves-Maisons (figure 21), où elle dépasse la valeur de VCI à usage sensible fixée à 130 mg.Kg<sup>-1</sup> (partie I synthèse bibliographique). Le sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique semble présenter une teneur en chrome plus élevée que celui du sol non traité, mais cette différence peut être liée, là encore, à l'hétérogénéité du sol et à l'échantillonnage. Pour le sol issu d'Homécourt, les valeurs sont sensiblement identiques d'un traitement à l'autre et ne dépassent pas la VCI à usage sensible.

La teneur en **mercure** (figure 21) varie, elle aussi, d'un sol à l'autre. Le sol non traité provenant d'Homécourt présente la teneur en mercure la plus importante, qui dépasse en effet la VCI à usage sensible du mercure fixée à 7 mg.Kg<sup>-1</sup> (partie I synthèse bibliographique) et qui est 8 à 15 fois plus élevée que celle des sols traités par biopile et par désorption

thermique. L'effet de ces traitements de remédiation, notamment la désorption thermique, est connu pour permettre la volatilisation du mercure par de hautes températures (Chang et Yen, 2006). Pour les sols de Neuves-Maisons, les teneurs en Hg sont inférieures à la VCI à usage sensible.

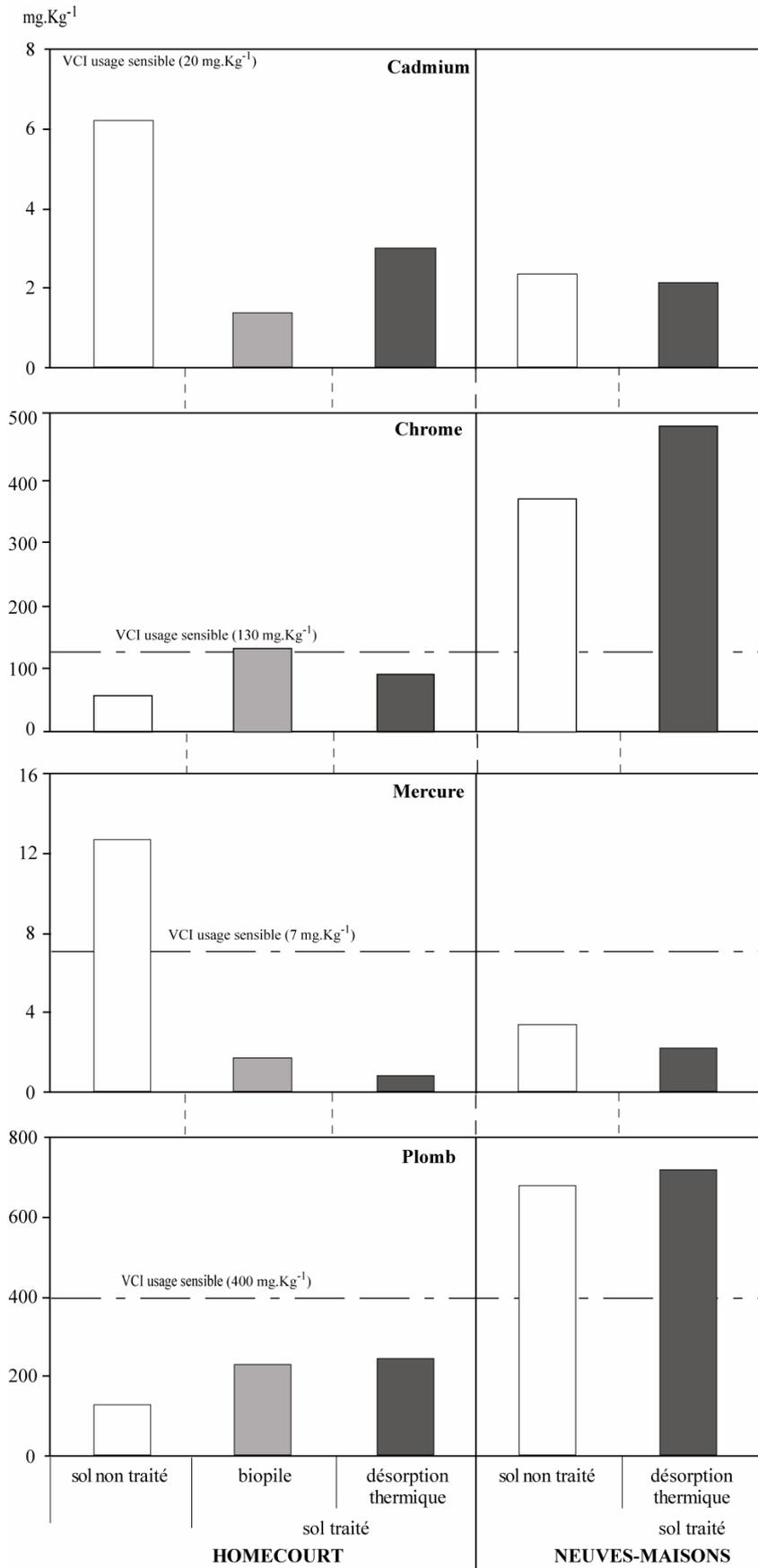
Les teneurs en **plomb** (figure 21) diffèrent surtout d'un sol à l'autre. Ses teneurs ne dépassent pas la VCI à usage sensible, fixée à  $400 \text{ mg.Kg}^{-1}$  (partie I synthèse bibliographique), dans les sols d'Homécourt, ce qui n'est pas le cas, pour les deux sols de Neuves-Maisons. De plus, les travaux de Biache *et al.* (soumis) qui ont porté sur des lots de sols identiques à ceux présentés ici ont mis en évidence que le plomb contenu dans ces sols était principalement sous forme stable.

Les teneurs en **arsenic** (résultats non présentés) dans le sol de Neuves-Maisons peuvent être plus ou moins élevées selon l'échantillon. Pour le sol non traité la teneur en As peut atteindre  $50 \text{ mg.Kg}^{-1}$  et  $80 \text{ mg.Kg}^{-1}$  pour le sol traité par désorption thermique. Cette contamination en arsenic n'est donc pas négligeable d'autant que la VCI à usage sensible est de  $37 \text{ mg.Kg}^{-1}$  pour cet élément.

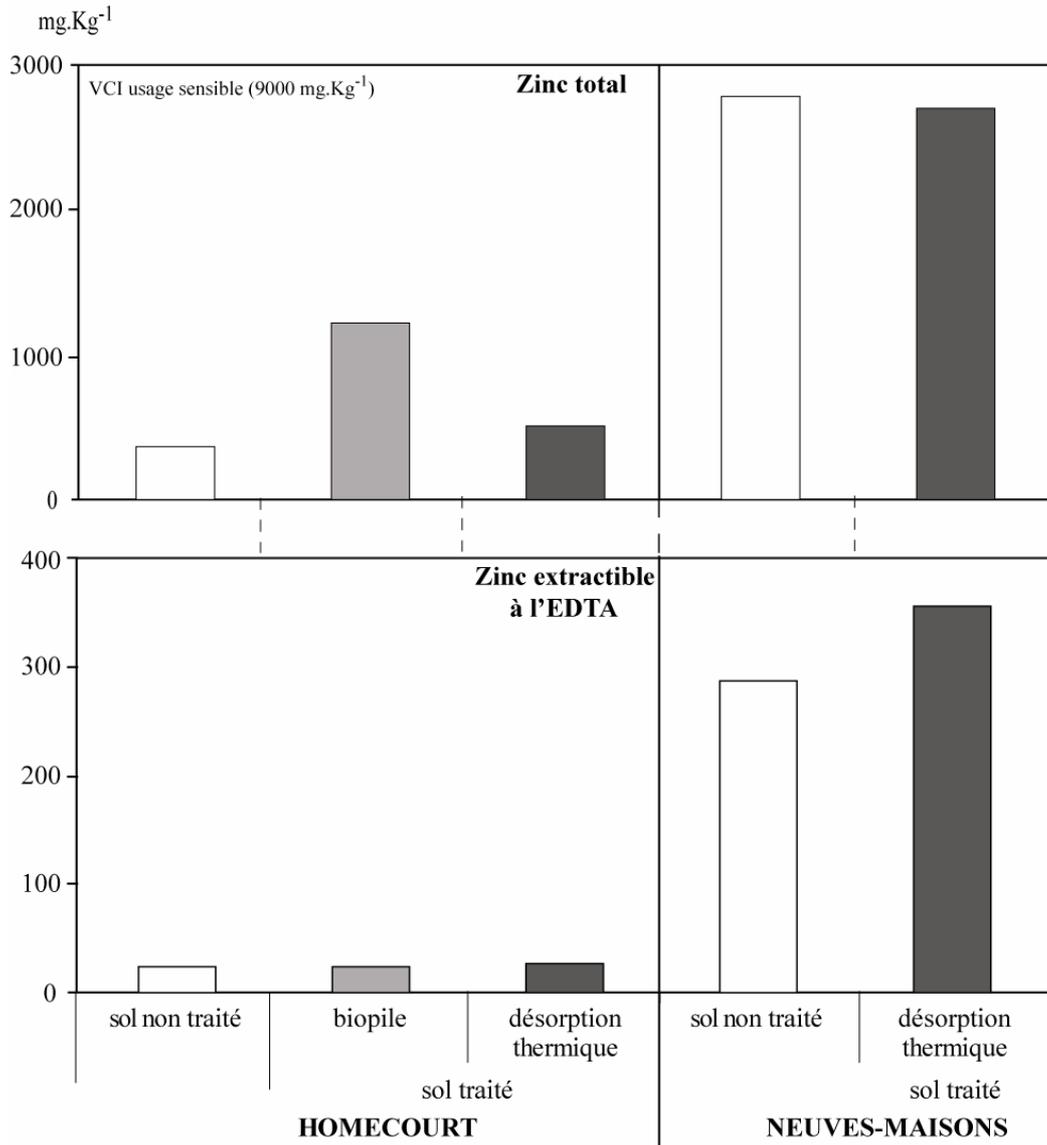
Les teneurs en zinc, bien que inférieures à la VCI à usage sensible, sont élevées dans le sol de Neuves-Maisons et, par exemple, dépassent largement l'ancienne valeur guide hollandaise pour laquelle une action curative était nécessaire.

Les teneurs en **zinc total** (figure 22) dans les trois sols d'Homécourt sont plus faibles que dans les sols de Neuves-Maisons. La tendance est similaire pour les teneurs en **zinc extractible** (figure 22). Pour le zinc total, il existe des différences de teneurs dans les trois sols—d'Homécourt pouvant, là encore être attribuées aux lots de sols utilisés et à l'hétérogénéité de l'échantillonnage. La teneur en zinc extractible est en revanche identique pour les trois sols de ce site. Pour le site industriel de Neuves-Maisons, en revanche, le sol non traité et le sol traité par désorption thermique proviennent exactement du même lot de sol, et il y a peu de différences entre les sols non traités et traités. Selon Biache *et al.* (soumis), le zinc serait plutôt associé aux oxydes amorphes dans le sol d'Homécourt. Cette fraction amorphe augmente après traitement par biopile et désorption thermique. Ces auteurs montrent également que, pour le sol de Neuves-Maisons, près de 20% du zinc extractible est sous une forme plus disponible (acido-soluble, complexée et échangeable). Le zinc du sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique serait davantage associé à la fraction stable (Biache *et al.*, soumis).

**PARTIE III - Chapitre I**  
**Caractérisation de la pollution et des propriétés biologiques des cinq sols étudiés**



**Figure 21 : Teneurs en cadmium, chrome, mercure et plomb total dans les le sol initial d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique et dans le sol initial de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique (Analyses INRA Arras, données GISFI).**



**Figure 22 : Teneurs en zinc total et extractible à l'EDTA dans le sol initial d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique et dans le sol initial de Neuves-maisons non traité et traité par désorption thermique (Analyses INRA Arras, données GISFI).**

Les analyses du **carbone organique** et de la **matière organique totale** (tableau 11, partie II matériels et méthodes) montrent des teneurs plus importantes dans le sol non traité d'Homécourt par rapport à celles du sol non traité de Neuves-Maisons. Par ailleurs, les traitements de décontamination contribuent à réduire ces teneurs. Cette réduction de la quantité de matière organique et, de là, le nombre de sites de fixation des ETM dans le sol peut également jouer un rôle sur leur disponibilité même si certains auteurs comme Kördel (1997) montrent que la matière organique a une faible influence sur la quantité de métal prélevée par les plantes.

## 2. PARAMETRES BIOLOGIQUES

### 2.1. TAUX DE GERMINATION DE LA LUZERNE

Le taux de germination de la luzerne sur les sols d'Homécourt et de Neuves-Maisons a été estimé pour chacun des deux sites. Les graines utilisées proviennent du même lot et ont été désinfectées de façon identique (partie II matériel et méthodes).

Pour le sol provenant d'Homécourt, les taux de germination diffèrent entre les trois sols (tableau 25). Le sol traité par désorption thermique a le taux de germination le plus élevé, tandis que le sol traité par biopile le plus faible. La germination des graines sur gélose montre une bonne capacité intrinsèque de ces graines. Pour le sol provenant de Neuves-Maisons, les taux de germination sont similaires entre les deux sols (tableau 25).

**Tableau 25 : Taux de germination des graines de luzernes désinfectées dans le sol initial d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique et dans le sol initial de Neuves-maisons non traité et traité par désorption thermique.**

Le taux de germination des graines de luzernes sur la gélose sert de témoin.

	HOMECOURT			NEUVES-MAISONS		<i>gélose</i>
	sol non traité	sol traité biopile	sol traité désorption thermique	sol non traité	sol traité désorption thermique	
Taux de germination	48 %	16 %	70 %	73 %	75 %	96-99 %

Les différences entre les taux de germination des sols du site d'Homécourt peuvent être dues à la quantité de HAP fortement diminuée dans le sol de désorption thermique. En revanche, le faible taux de germination observé pour le sol d'Homécourt traité par biopile ne semble pas avoir d'explication par rapport à la teneur en polluants. Cette inhibition du développement des graines sur ce sol pourrait être due à une autre origine telle que la présence dans ce sol de métabolites secondaires toxiques ou être d'origine biologique. Cependant, la teneur en HAP, plus faible sur le sol de Neuves-Maisons, ne semble pas influencer la germination des graines. La concentration plus importante en ETM pour le sol de Neuves-Maisons pourrait expliquer la réduction de germination par rapport au témoin sur gélose, mais le taux de germination est toutefois plus élevé que sur les sols d'Homécourt. Ainsi, ces cinq sols présentent des potentiels variables vis-à-vis de la germination de la luzerne ce qui permet d'envisager également différents potentiels vis-à-vis de la culture de la plante.

## 2.2. DENOMBREMENT DE BACTERIES CULTIVABLES ET DEGRADANT LES HAP

Les dénombrements de la microflore bactérienne montrent que le nombre de bactéries totales présentes dans le sol non traité du site industriel de Neuves-Maisons semble plus élevé que dans le sol d'Homécourt. Une même tendance est observée pour le nombre de bactéries dégradant les HAP, mais les différences ne sont pas significatives, en raison d'une forte hétérogénéité dans les données (tableau 26).

Pour les sols d'Homécourt et de Neuves-Maisons, le nombre de bactéries diminue significativement après traitement du sol (surtout par désorption thermique) (tableau 26). Pour le sol de Neuves-Maisons, la réduction du nombre de bactéries après traitement par désorption thermique est plus importante pour le sol prélevé le lendemain du traitement ( $t_0$ ) que pour ce même sol prélevé au bout de 8 mois ( $t_8$ ) traduisant une probable recolonisation du sol.

**Tableau 26 : Dénombrement bactérien dans le sol initial d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique et dans le sol initial de Neuves-maisons non traité et traité par désorption thermique.**

Les analyses statistiques sont réalisées par ANOVA dans un premier temps pour permettre la comparaison des deux sites industriels puis, dans un deuxième temps entre les différents sols d'un même site industriel. Deux lettres distinctes indiquent des différences significatives, avec \* :  $p \leq 0,05$  et n.s.: effet non significatif.

	Homécourt			Neuves-Maisons		
	non traité	traité par biopile	traité par désorption thermique	non traité	traité par désorption thermique	
					$t_0$	$t_8$
bactéries totales en bactéries.g <sup>-1</sup> sol	1,42.10 <sup>5</sup>	1,89.10 <sup>4</sup>	1,32.10 <sup>4</sup>	2,30.10 <sup>6</sup>	1,42.10 <sup>3</sup>	2,45.10 <sup>4</sup>
bactéries dégradant les HAP en bactéries.g <sup>-1</sup> sol	2,53.10 <sup>4</sup>	2,24.10 <sup>3</sup>	3,96.10 <sup>3</sup>	4,35.10 <sup>5</sup>	6,52.10 <sup>2</sup>	3,06.10 <sup>4</sup>
<b>bactéries dégradant les HAP/microflore totale en %</b>	<b>18 %</b>	<b>12 %</b>	<b>30 %</b>	<b>19 %</b>	<b>46 %</b>	<b>125 %</b>

<i>ANOVA</i>	<i>bactéries totales</i>	<i>S</i>	<i>n.s.</i>			<i>n.s.</i>	
		<i>S*</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i> <i>c</i>
	<i>bactéries dégradantes</i>	<i>S</i>	<i>n.s.</i>			<i>n.s.</i>	
		<i>S*</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i> <i>n.s.</i>

Le rapport entre les bactéries dégradant les HAP et les bactéries totales a été calculé pour refléter le pourcentage relatif de bactéries dégradantes. Ce mode de calcul, à partir de dénombrements faits séparément et sur des milieux différents, peut expliquer le pourcentage supérieur à 100 observé pour le sol traité par désorption thermique à  $t_8$ . Les pourcentages de bactéries dégradantes sont identiques pour les sols non traités des deux sites.

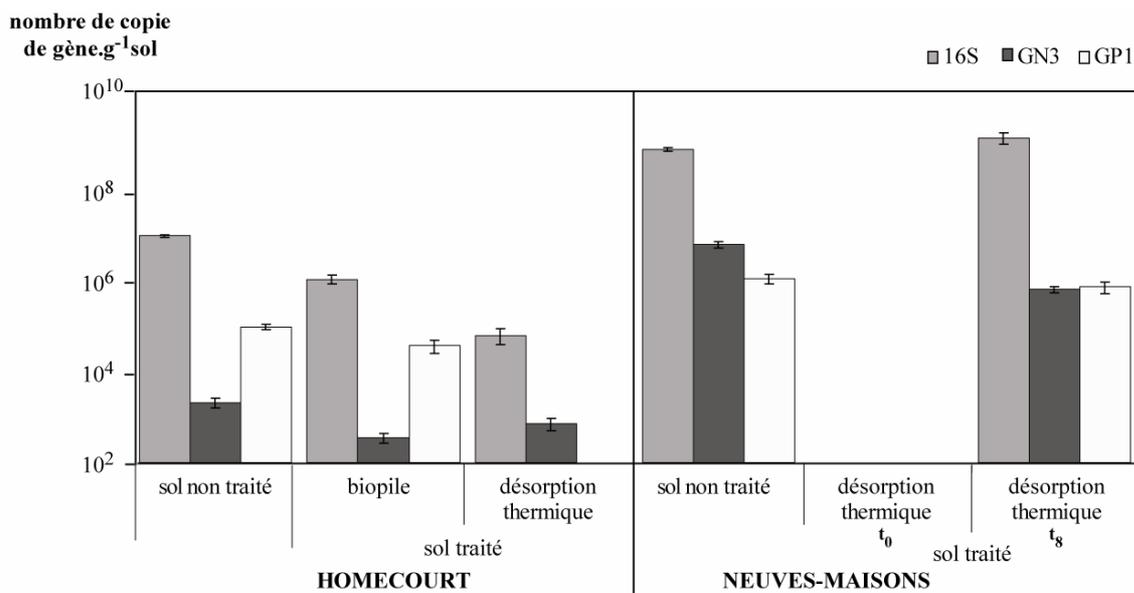
Les dénombrements de la microflore bactérienne montrent que le nombre de bactéries totales présentes dans le sol non traité du site industriel de Neuves-Maisons semble plus élevé que dans le sol d'Homécourt. Une même tendance est observée pour le nombre de bactéries dégradant les HAP, mais les différences ne sont pas significatives, en raison d'une forte hétérogénéité dans les données (tableau 26).

Pour les sols d'Homécourt et de Neuves-Maisons, le nombre de bactéries diminue significativement après traitement du sol (surtout par désorption thermique) (tableau 26). Pour le sol de Neuves-Maisons, la réduction du nombre de bactéries après traitement par désorption thermique est plus importante pour le sol prélevé le lendemain du traitement ( $t_0$ ) que pour ce même sol prélevé au bout de huit mois ( $t_8$ ) traduisant une probable recolonisation du sol (tableau 26).

Ce rapport tend à diminuer après le traitement par biopile, tandis qu'il augmente après les traitements par désorption thermique. Le sol traité par désorption thermique de Neuves-Maisons a ainsi le rapport le plus important à  $t_0$  et ce rapport augmente entre  $t_0$  et  $t_8$  (tableau 26).

### 2.3. QUANTIFICATION DES GENES 16S ET DE GENES DE DEGRADATION DES HAP

L'analyse statistique montre des différences significatives entre les sols des deux sites tant au niveau du nombre de copies de gène 16S que du nombre de copies de gènes de NDO pour les bactéries Gram + et Gram - (figure 23). Ainsi, le sol de Neuves-Maisons non traité renferme davantage de copies de gènes 16S et davantage de bactéries dégradant les HAP de type Gram + et Gram - que le sol d'Homécourt. Il faut souligner que les bactéries dégradantes Gram + dominent dans le sol d'Homécourt non traité tandis que c'est l'inverse dans le sol de Neuves-Maisons non traité, comme le montre le rapport entre le nombre de copies de gène de NDO par rapport au nombre de copies de gène 16S (figure 24).



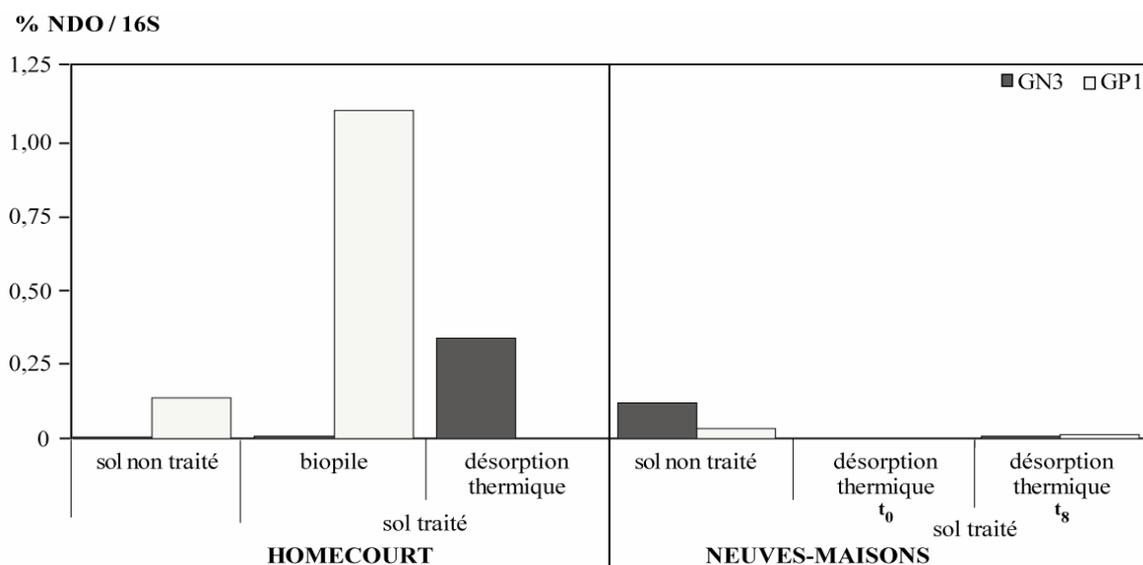
**ANOVA**

S* GP1		<i>a</i>			<i>b</i>	
S* 16S et GP1	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>
S* GN3	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>

**Figure 23 : Nombre de copies de gène 16S, de gène NDO pour les bactéries Gram + (GP1) et les bactéries Gram – (GN3) obtenues par technique de PCR en temps réel sur le sol initial d’Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique et dans le sol initial de Neuves-maisons non traité et traité par désorption thermique.**

Les analyses statistiques sont réalisées par ANOVA dans un premier temps pour permettre la comparaison des deux sites industriels puis, dans un deuxième temps entre les différents sols d’un même site industriel. Deux lettres distinctes indiquent des différences significatives, avec \* :  $p \leq 0,05$  et n.s. : effet non significatif. Les erreurs standard sont données pour les différentes répétitions ( $n=3$ , avec 3 runs par répétition).

Pour les sols du site industriel d’Homécourt, le nombre de copies de gène 16S et de gène de NDO pour les Gram + est significativement plus faible dans le sol traité par biopile, et encore plus faible dans le sol traité par désorption thermique, que dans le sol non traité. En revanche, le calcul du pourcentage des gènes de bactéries dégradantes par rapport au 16S montre que dans le sol traité par biopile, c’est la proportion de bactéries dégradantes Gram + qui augmente significativement (figure 24). Le nombre de copies de gène de NDO des bactéries Gram – (GN3) est aussi significativement plus faible dans les sols traités que dans le sol non traité mais n’est pas significativement différent entre les deux sols traités. Il faut souligner que le nombre de copies de gènes de bactéries dégradantes Gram + est en dessous de la limite de détection de la méthode pour le sol traité par désorption thermique. Le rapport NDO/16S (figure 24) montre aussi l’augmentation des gènes NDO de Gram – par rapport au sol non traité. La restauration d’une microflore dégradante dans le sol d’Homécourt traité par désorption thermique se fait donc prioritairement avec des bactéries Gram –.



**ANOVA**

S* GN3/16S		<i>a</i>			<i>b</i>	
S* GN3/16S	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>
S* GP1/16S	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>ab</i>

**Figure 24 : Rapport entre le nombre de copies gène de NDO pour les bactéries Gram + (GP1) et Gram – (GN3) et le nombre de copies de gène 16S obtenues par technique de PCR en temps réel sur le sol initial d’Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique et dans le sol initial de Neuves-maisons non traité et traité par désorption thermique.**

Les analyses statistiques sont réalisées par ANOVA dans un premier temps pour permettre la comparaison des deux sites industriels puis, dans un deuxième temps entre les différents sols d’un même site industriel. Deux lettres distinctes indiquent des différences significatives, avec \* :  $p \leq 0,05$  et n.s. : effet non significatif. Les valeurs sont données pour  $n=3$ .

Pour le sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique récolté le lendemain de son traitement ( $t_0$ ), la quantification par PCR en temps réel du nombre de copie de gènes n’a pas été possible. En revanche, dans le même sol après 8 mois, on retrouve un nombre de copies de gènes 16S et de NDO GP1 non significativement différent de celui du sol non traité, tandis que le nombre de copies de gène GN3 reste inférieur à celui du sol non traité. Les rapports NDO/16S montrent que le sol non traité contient relativement plus de gènes de bactéries dégradantes Gram –, mais que le pourcentage de gènes de NDO reste plus faible dans le sol traité par désorption thermique que dans le sol non traité même après 8 mois (figure 24).

### 3. DISCUSSION

#### 3.1. CONTAMINATION EN HAP ET EN ETM DES SOLS ETUDIÉS

Les analyses montrent une répartition différente des HAP dans les deux sols non traités : le sol d’Homécourt ayant davantage d’HAP de faible poids moléculaire que celui de

Neuves-Maisons. Le traitement par biopile du sol d'Homécourt a conduit à des réductions des HAP les plus légers et une augmentation relative des HAP les plus lourds. Les deux traitements de désorption thermique ont des répartitions similaires. Cependant ce traitement a réduit les HAP à 3 cycles et augmenté les HAP à 5 cycles pour le sol d'Homécourt tandis que ce traitement n'a pas modifié la répartition des hydrocarbures entre le sol non traité et le sol traité par désorption thermique de Neuves-Maisons.

Ainsi, les cinq sols analysés diffèrent du point de vue de leur teneur en HAP qui a été plus ou moins réduite selon le traitement, mais aussi sur la répartition de ceux-ci. Ces différences peuvent avoir des conséquences en termes de biodisponibilité et de biodégradabilité de ces polluants.

Globalement, les sols issus du site industriel de Neuves-Maisons ont une contamination en ETM plus importante que les sols issus du site industriel d'Homécourt, avec des teneurs en plomb, en chrome et en arsenic dépassant les VCI à usage sensible. Les teneurs en Zn extractibles à l'EDTA, qui peuvent refléter les teneurs biodisponibles sont aussi supérieures à la VCI à usage sensible dans les sols de Neuves-Maisons. Cette notion de biodisponibilité des éléments est importante pour évaluer l'impact de la pollution de ces sols sur la végétation et sur les microorganismes du sol. En effet, McLaren (1984) montre des corrélations sol-luzerne pour le Zn extrait à l'EDTA. L'extraction à l'EDTA est définie par une norme AFNOR (2004) pour définir les teneurs de cuivre, zinc et manganèse assimilable par les plantes.

Les sols de Neuves-Maisons apparaissent plus contaminés en ETM que les sols d'Homécourt. Cette différence de contamination en ETM des sols de Neuves-Maisons peut laisser présager un comportement différent de ces sols par rapport à ceux d'Homécourt, notamment pour la culture de plantes. Les valeurs de pH de ces sols ne permettront certainement pas une forte mobilité des ETM. Néanmoins, l'absorption de l'arsenic par les végétaux se fait pour des pH inférieurs à 5 ou supérieurs à 8 (Juste *et al.*, 1995). Ainsi, le sol de Neuves-Maisons, contaminé en As, peut conduire à une accumulation de ce métalloïde par les plantes, notamment pour le sol traité par désorption thermique (pH = 8).

Selon les travaux de Biache *et al.* (soumis), les traitements de décontamination modifieraient la compartimentation du zinc en faveur de la fraction amorphe pour le sol du site industriel d'Homécourt et en faveur de la fraction stable pour le site industriel de Neuves-Maisons. Ces analyses de la compartimentation des ETM, et notamment du zinc suggèrent également une faible biodisponibilité des métaux.

### 3.2. GERMINATION DE LA LUZERNE DANS LES SOLS ETUDIÉS

Différentes expériences ont montré l'intérêt de l'utilisation de la luzerne dans des expériences de remédiation de HAP (Nichols *et al.*, 1997 ; Reilley *et al.*, 1996). Kirk *et al.* (2002) montrent, par ailleurs, que sur des sols contaminés en HAP, la luzerne offre un des meilleur taux de germination avec le ray grass et que celle-ci résistait le mieux à la contamination. La mesure de la germination de la luzerne sur les cinq sols étudiés montre que le sol non traité d'Homécourt, le plus contaminé en HAP, réduit la germination de la luzerne par rapport au témoin et par rapport au sol non traité de Neuves-Maisons. Smith *et al.* (2006) n'ont pas observé de réduction visible de la germination de la luzerne à la suite d'une exposition à des HAP tandis que d'autres auteurs montrent une réduction de la germination en présence de HAP (Smreczak et Maliszewska-Kordybach, 2003 ; Chaineau *et al.*, 1997). Cependant, cette réduction du taux de germination est observée dans des expériences où les sols étaient fraîchement contaminés. En revanche, malgré des taux de germination élevés, Smith *et al.* (2006) montrent que ce paramètre ne permet pas de prédire la croissance des plantes sur des sols contaminés en HAP. Ainsi, s'il existe une différence de potentiel de germination de la luzerne dans les sols non traités, une culture de plante sur ces sols s'avère nécessaire pour évaluer l'impact de la contamination sur les plantes.

### 3.3. MICROFLORE CULTIVABLE ET DEGRADANT LES HAP DANS LES SOLS ETUDIÉS

Les dénombrements de bactéries cultivables montrent un nombre de bactéries plus élevé dans le sol non traité de Neuves-Maisons par rapport à celui d'Homécourt, mais surtout une diminution du nombre de bactéries après traitement par biopile et par désorption thermique. On peut ainsi souligner que la quantité de bactéries totales et dégradantes ne semble pas liée directement à la concentration de HAP dans le sol, puisque le sol d'Homécourt en contient des concentrations plus élevées que le sol de Neuves-Maisons.

Le sol de Neuves-Maisons est, cependant, le plus contaminé en ETM et cette contamination peut aussi réduire la biomasse bactérienne totale (Fliessbach *et al.*, 1994 ; Brookes et McGrath, 1984). Cependant, il s'agit ici de pollutions anciennes et les communautés microbiennes ont pu s'adapter et devenir tolérantes aux polluants (Bååth *et al.*, 1989).

Contrairement à ce que l'on pouvait attendre en raison de la stimulation des bactéries par aération du sol et apport de nutriments, le traitement du sol par biopile n'a pas augmenté la microflore bactérienne. Il apparaît que l'on peut trouver une microflore bactérienne dans le

sol traité par désorption thermique. Ces observations peuvent être attribuées au fait que, pour le sol d'Homécourt traité par biopile et traité par désorption thermique, les sols ont été échantillonnés huit mois après leurs traitements permettant ainsi des modifications de la microflore bactérienne, et une recolonisation éventuelle dans le cas du sol traité par désorption thermique. En revanche, cette explication n'est pas valable pour le sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique qui a été récolté le lendemain de son traitement. Mais le refroidissement du sol en sortie de traitement par de l'eau non stérile, pourrait expliquer ce résultat. Il faut souligner aussi que le pourcentage de bactéries dégradantes cultivables est plus élevé dans les sols traités par désorption thermique que dans les sols non traités, et que ce pourcentage augmente au cours du temps dans le sol traité, bien que la concentration en HAP ait diminué considérablement.

La quantification des gènes 16S a aussi montré que le sol d'Homécourt est moins riche en bactéries que le sol de Neuves-Maisons. La quantification des gènes de NDO a permis de préciser que le sol d'Homécourt contient majoritairement des bactéries dégradantes (possédant le gène de la NDO) Gram + tandis que le sol de Neuves-Maisons a un pourcentage plus élevé de bactéries dégradantes Gram -. Les analyses moléculaires des bactéries totales et des bactéries possédant les gènes codant la NDO montrent que le traitement de dépollution du sol d'Homécourt a réduit le nombre de bactéries, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus par dénombrement de bactéries cultivables. Elles ont permis de préciser que le sol traité par biopile a été enrichi en bactéries dégradantes Gram +, tandis le traitement par désorption thermique a augmenté le pourcentage de bactéries dégradantes Gram -. Elles montrent que le rapport NDO/16S a augmenté après traitement par biopile et par désorption thermique. Ainsi, les deux méthodes semblent donner des résultats opposés sur le pourcentage de bactéries dégradantes après traitement par biopile. Cependant, il faut noter que la méthode de dénombrement en microplaques concerne les bactéries cultivables, et capables de transformer un mélange de 4 HAP en culture *in vitro*, tandis que la méthode de quantification des gènes concerne la présence d'un gène de dégradation, et non son expression, pour l'ensemble des bactéries des sols étudiés.

## CONCLUSION

Les principaux résultats de cette caractérisation indiquent que :

- (i) le sol d'Homécourt est plus contaminé en HAP, mais contient, proportionnellement, davantage de HAP à 3 cycles, que le sol de Neuves-Maisons, qui contient davantage de HAP

à 5 cycles. En revanche la contamination en ETM (chrome, plomb, zinc et arsenic) est plus importante dans le sol de Neuves-Maisons où les teneurs dépassent, sauf pour le zinc, les VCI usage sensible,

(ii) les traitements de décontamination n'agissent pas sur les teneurs en ETM, mais réduisent la concentration en HAP bien qu'ils ne soient pas complètement éliminés. Le traitement par biopile conduit à un enrichissement relatif en HAP à 5 cycles, tandis que le traitement par désorption thermique modifie moins ou pas la proportion des HAP lourds et légers,

(iii) le taux de germination de la luzerne est plus faible dans le sol d'Homécourt que dans celui de Neuves-Maisons, qui est lui-même plus faible que celui du témoin sur gélose. La germination est fortement inhibée dans le sol traité par biopile mais pas dans le sol traité par désorption thermique,

(iv) la quantité de bactéries cultivables totales et dégradantes et le nombre de copies de gènes 16S et NDO sont plus élevés dans le sol de Neuves-Maisons que dans celui d'Homécourt. Ces nombres de copies sont plus faibles dans les sols traités par biopile et par désorption thermique que dans les sols non traités,

(v) le sol d'Homécourt contient majoritairement des bactéries dégradantes Gram +, et celui de Neuves-Maisons des Gram -. Après traitement, des changements dans ces communautés fonctionnelles sont observés, avec notamment dans le sol d'Homécourt traité par désorption thermique les bactéries dégradantes Gram - qui deviennent dominantes.

# PARTIE III

## CHAPITRE II

---

Dynamique des polluants et des communautés microbiennes  
dans la rhizosphère de luzerne mycorhizée ou non:  
cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt



site d'Homécourt



traitement par biopile



traitement par désorption thermique



## INTRODUCTION

La caractérisation de la pollution et des propriétés biologiques du sol d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique (partie III, chapitre I) a permis de mettre en évidence l'effet des différents traitements sur la pollution résiduelle et sur la microflore tellurique. Les différences de germination et la quantité de bactéries présente dans ces sols ne permettent pas d'anticiper le comportement du sol non traité et des deux sols traités vis-à-vis de la culture de plantes. Le présent chapitre étudie, par une culture de luzerne en vase de végétation inoculée ou non par un champignon mycorhizien *Glomus intraradices* et avec un apport de fertilisation, (i) l'impact de la pollution et des traitements de décontamination sur la croissance et la survie des plantes et la structure globale des communautés microbiennes et (ii) la dynamique des polluants (HAP, métaux) en présence de la luzerne et de *Glomus intraradices* et l'impact des communautés microbiennes de ces sols.

### 1. CONDUITE DE L'EXPERIENCE

Les trois sols issus de l'ancienne cokerie d'Homécourt ont été utilisés au cours de cette expérience : le sol non traité, le sol traité par biopile et le sol traité par désorption thermique. Ces sols ont été utilisés sans stérilisation préalable dans une expérience en vase de végétation avec de la luzerne. La culture a été menée selon quatre modalités avec ou sans apport de fertilisation et d'inoculum mycorhizien (partie II) :

- (i) inoculé et fertilisé (I/F)
- (ii) inoculé et non fertilisé (I/NF)
- (iii) non inoculé et fertilisé (NI/F)
- (iv) non inoculé et non fertilisé (NI/NF)

Les quatre traitements ont été réalisés pour chacun des trois sols, avec quatre répétitions par traitement et cinq plantes par pot contenant 1 Kg de sol sec. Cette culture a été menée durant 56 jours, sous conditions contrôlées (partie II). Les paramètres mesurés ont été la survie des plantes, la biomasse sèche, la teneur en éléments majeurs et en traces dans les parties aériennes et les racines, la colonisation mycorhizienne par coloration de racines, la présence de nodules sur les racines, la structure des communautés bactériennes et fongiques dans le sol rhizosphérique et les champignons mycorhiziens dans les racines par extraction d'ADN et PCR-TTGE, la teneur en HAP dans les sols non rhizosphériques et rhizosphériques prélevés en fin d'expérience.

**N.B.** : L'ordre de présentation des chapitres de résultats ne correspond pas à un ordre chronologique de réalisation. Cette expérience et la suivante (chapitre III partie III) ont en fait été réalisées avant la mise en place de la technique de PCR en temps réel au LIMOS. C'est pourquoi cette technique n'a pas été utilisée pour analyser les données de ces expériences.

## 2. RESULTATS

### 2.1. CROISSANCE DES PLANTES

#### 2.1.1. Survie des plantes

En considérant l'ensemble des trois sols, la survie des plantes à l'issue de la culture a été influencée par le traitement du sol (tableau 27). Le sol traité par biopile a conduit au taux de survie de la luzerne le plus faible (50 % pour les traitements non inoculés et près de 70 % pour les traitements inoculés) qui est significativement différent ( $p \leq 0,01$ ) de celui observé sur le sol non traité ou sur le sol traité par désorption thermique (respectivement 85-100 % et 80-95 % de survie). Sur chacun des sols, l'inoculation et la fertilisation n'ont pas eu d'effet significatif sur la survie des plantes.

**Tableau 27: Survie des plantes après 56 jours de culture de la luzerne sur le sol d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.**

Les erreurs standard sont données pour  $n=4$ . Pour l'ensemble des sols, les analyses statistiques sont réalisées sur le paramètre sol (S) par ANOVA à trois niveaux, et sur chaque sol sur les paramètres inoculation (I) et fertilisation (F) par ANOVA à deux niveaux. Les différences significatives sont données, pour le paramètre S, par deux lettres distinctes et sont précisées, pour l'ensemble des paramètres, avec \*\*:  $p \leq 0,01$  et n.s. : effet non significatif.

		Sol traité		
		Sol non traité	biopile	désorption thermique
Survie %	NI/NF	100,0 ± 0,0	50,0 ± 5,0	90,0 ± 5,0
	NI/F	100,0 ± 0,0	50,0 ± 10,0	80,0 ± 10,0
	I/NF	95,0 ± 3,8	65,0 ± 12,5	80,0 ± 0,0
	I/F	85,0 ± 7,5	75,0 ± 7,5	95,0 ± 3,8
<i>ANOVA</i>	<i>S</i> **	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>
	<i>I</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
	<i>F</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
	<i>IxF</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

## PARTIE III - Chapitre II

Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt



Figure 25 : Photographies du dispositif après 56 jours de culture

### 2.1.2. Biomasse des plantes

L'analyse statistique réalisée sur l'ensemble des données montre que la biomasse des parties aériennes et des racines de la luzerne (figures 25 et 26) est significativement influencée par le traitement du sol ( $p \leq 0,01$ ). Le sol non traité présente la plus forte croissance des plantes et le sol traité par désorption thermique la plus faible (figures 25 et 26). Ces résultats sont similaires pour la biomasse des parties aériennes et celle des racines. Ainsi, la biomasse des parties aériennes de la modalité non inoculée et non fertilisée (NI/NF) pour le sol traité par désorption thermique est 7 fois plus faible que pour le sol non traité.

## PARTIE III - Chapitre II

### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt

Pour les trois sols, l'inoculation mycorhizienne a un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) sur la biomasse des parties aériennes, mais un effet opposé pour les sols traités et non traités. En effet, pour le sol non traité, l'inoculation diminue la biomasse, tandis qu'elle l'augmente dans les sols traités. Même si les données de biomasse racinaire montrent les mêmes tendances, l'inoculation a un effet non significatif pour les racines. La fertilisation, quant à elle, montre une tendance à augmenter la biomasse des parties aériennes et des racines, mais cet effet n'est significatif que pour le sol traité par désorption thermique. En revanche, pour le sol traité par désorption thermique, on peut noter un effet significatif de la combinaison de l'inoculation et de la fertilisation qui augmente la biomasse des parties aériennes ( $p \leq 0,01$ ) et des racines ( $p \leq 0,05$ ).

## 2.2. NUTRITION MINERALE

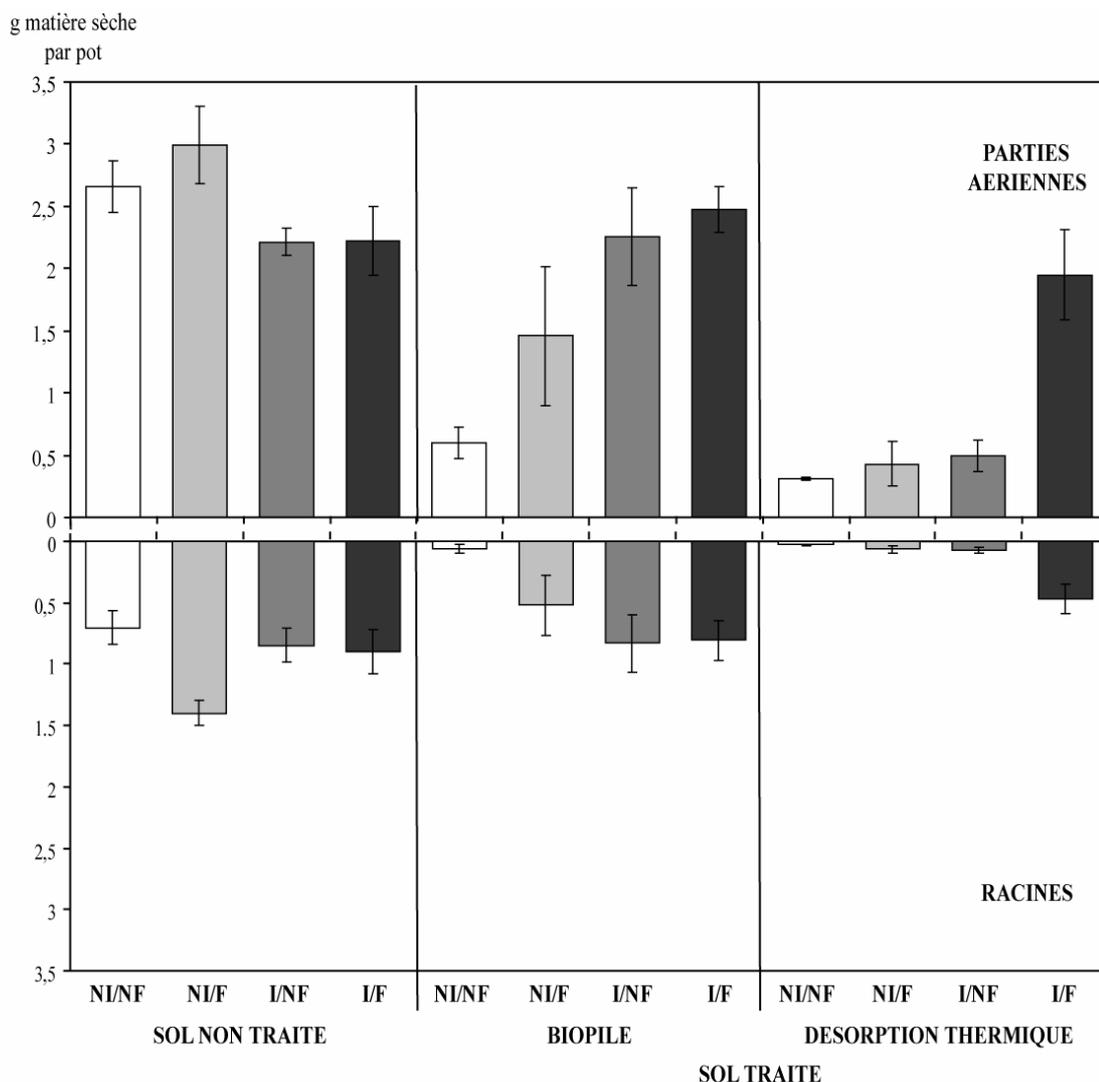
### 2.2.1. Teneur en phosphore

Les teneurs en phosphore des parties aériennes et des racines (figure 27) montrent des différences significatives entre le sol traité par biopile et les deux autres sols ( $p \leq 0,05$ ). Le sol traité par biopile présente la plus forte teneur en phosphore dans les plantes et le sol traité par désorption thermique la plus faible (figure 27). Ces résultats sont similaires pour la teneur en phosphore des parties aériennes et celle des racines.

Pour le sol non traité, l'inoculation et la fertilisation ont un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) sur la teneur en phosphore, qui augmente dans les racines, mais non significatif pour les parties aériennes. Pour le sol traité par biopile seule l'inoculation a un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) sur la teneur en phosphore des racines mais non significatif pour les parties aériennes. L'inoculation mycorhizienne augmente significativement ( $p \leq 0,05$ ) la teneur en phosphore des parties aériennes et des racines sur le sol traité par désorption thermique et la fertilisation a un effet significatif uniquement sur la teneur en phosphore des parties aériennes ( $p \leq 0,05$ ).

### PARTIE III - Chapitre II

#### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt



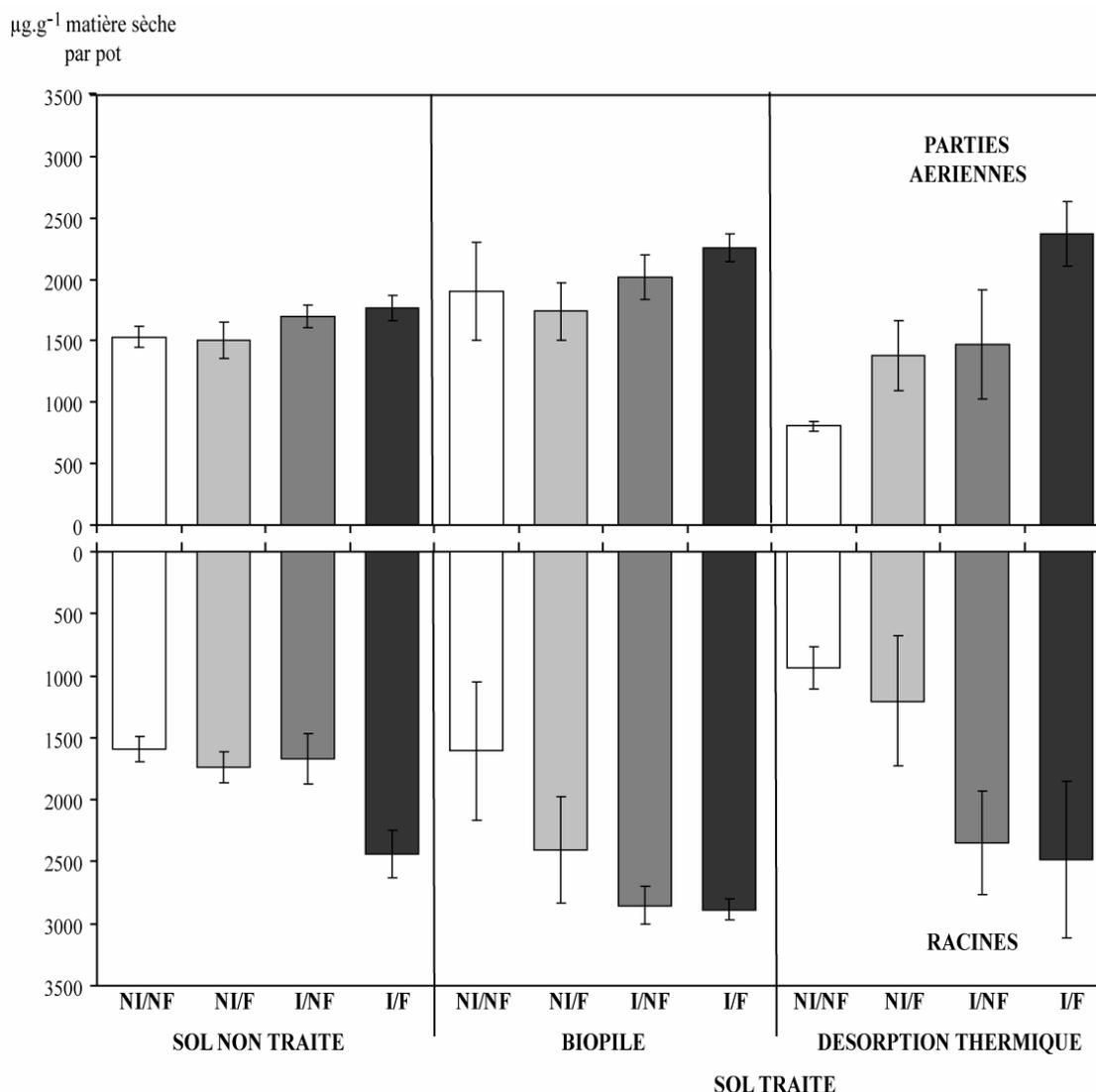
#### ANOVA

	S ***	a	b	c
Parties aériennes	I	*	**	**
	F	n.s.	n.s.	**
	IxF	n.s.	n.s.	**
Racines	I	n.s.	n.s.	*
	F	n.s.	n.s.	*
	IxF	n.s.	n.s.	*

**Figure 26 : Biomasse des parties aériennes et des racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.**

Les barres présentent les erreurs standard (n=4). Les analyses statistiques sont réalisées sur le paramètre sol (S) par ANOVA à trois niveaux, et pour chaque sol sur les paramètres inoculation (I) et fertilisation (F) par ANOVA à deux niveaux. Les différences significatives sont données, pour le paramètre S, par deux lettres distinctes et sont précisées, pour l'ensemble des paramètres, avec \* :  $p \leq 0,05$ , \*\* :  $p \leq 0,01$ , \*\*\* :  $p \leq 0,001$  et n.s. : effet non significatif. L'ANOVA à trois niveaux donne les mêmes résultats pour les parties aériennes et les racines.

**PARTIE III - Chapitre II**  
**Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt**



**ANOVA**

	S *	a	b	a
Parties aériennes	I	n.s.	n.s.	*
	F	n.s.	n.s.	*
	IxF	n.s.	n.s.	n.s.
Racines	I	*	*	*
	F	*	n.s.	n.s.
	IxF	n.s.	n.s.	n.s.

**Figure 27 : Teneur en phosphore des parties aériennes et des racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.**

Les barres présentent les erreurs standard (n=4). Les analyses statistiques sont réalisées sur le paramètre sol (S) par ANOVA à trois niveaux, et pour chaque sol sur les paramètres inoculation (I) et fertilisation (F) par ANOVA à deux niveaux. Les différences significatives sont données, pour le paramètre S, par deux lettres distinctes et sont précisées, pour l'ensemble des paramètres, avec \* :  $p \leq 0,05$  et n.s : effet non significatif. L'ANOVA à trois niveaux donne les mêmes résultats pour les parties aériennes et les racines.

### **2.2.2. Teneur en éléments majeurs**

Les teneurs en éléments majeurs (magnésium, calcium et potassium) montrent peu de différences significatives entre les modalités. Pour cette raison, les résultats sont présentés de façon synthétique dans le tableau 28 et le détail des mesures est présenté dans l'annexe 1.

Les teneurs en fer ne montrent pas de différences significatives pour les parties aériennes et les racines, ni entre les sols (tableau 28), ni entre les modalités (annexe 1).

Les teneurs en magnésium dans les plantes montrent des différences significatives entre les trois sols ( $p \leq 0,001$  pour les parties aériennes et  $p \leq 0,05$  pour les racines). Pour le sol non traité, la fertilisation a un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) sur la teneur en magnésium dans les parties aériennes tandis que l'inoculation a un effet significatif sur la teneur en magnésium dans les racines du sol traité par biopile ( $p \leq 0,05$ ) et sur les parties aériennes du sol traité par désorption thermique ( $p \leq 0,05$ ).

Les teneurs en calcium dans les plantes montrent des différences significatives entre les trois sols pour les parties aériennes ( $p \leq 0,05$ ) et des différences non significatives pour les racines.

Les teneurs en potassium dans les plantes montrent des différences significatives entre les trois sols pour les parties aériennes ( $p \leq 0,001$ ) et des différences non significatives pour les racines. La fertilisation a un effet significatif au niveau des parties aériennes de la luzerne sur le sol non traité.

## **2.3. PARAMETRES MICROBIOLOGIQUES**

### **2.3.1. Estimation de la colonisation mycorhizienne**

#### *2.3.1.1. Paramètres de mycorhization*

L'analyse statistique des données montre que la fréquence de mycorhization des racines (tableau 29) est significativement et fortement influencée par le traitement du sol ( $p \leq 0,001$ ). Ainsi, le sol non traité présente une forte fréquence de mycorhization (98% à 100%) quelle que soit la modalité, tandis qu'elle est nettement plus faible dans le sol traité par biopile et encore plus faible dans le sol traité par désorption thermique, où elle est même inexistante dans la modalité non inoculée et non fertilisée.

Sol traité	Fe		Mg		Ca		K	
	parties aériennes	racines	parties aériennes	racines	parties aériennes	racines	parties aériennes	racines
Sol non traité	0,18 ± 0,02	1,76 ± 0,64	1,46 ± 0,08	1,36 ± 0,13	10,38 ± 0,39	4,94 ± 0,76	21,53 ± 1,65	12,59 ± 1,97
biopile	0,19 ± 0,07	1,56 ± 0,52	2,87 ± 0,31	2,82 ± 0,82	7,97 ± 0,98	8,08 ± 4,29	22,90 ± 1,80	18,30 ± 2,98
désorption thermique	0,18 ± 0,06	1,98 ± 0,79	2,22 ± 0,22	3,95 ± 0,98	13,53 ± 1,65	10,15 ± 2,85	26,49 ± 1,89	34,66 ± 26,44

## ANOVA

<i>Sol non traité</i>	<i>S</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	*	*	<i>n.s.</i>	*	<i>n.s.</i>
<i>biopile</i>		<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
<i>désorption thermique</i>		<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
		<i>a</i>	<i>a</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>a</i>

**Tableau 28 : Teneurs en éléments majeurs (Fe, Mg, Ca et K) dans les parties aériennes et les racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique. Les données présentées sont les valeurs moyennes des 4 modalités.**

Les erreurs standard sont données entre parenthèse (n=4). Pour l'ensemble des sols, les analyses statistiques sont réalisées sur le paramètre sol (S) par ANOVA à trois niveaux. Les différences significatives sont données, pour le paramètre S, par deux lettres distinctes et sont précisées, pour l'ensemble des paramètres, avec \* :  $p \leq 0,05$ , \*\*\* :  $p \leq 0,001$  et n.s. : effet non significatif.

### PARTIE III - Chapitre II

#### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt

Pour le sol non traité, l'inoculation et la fertilisation n'ont pas d'effet sur la fréquence de la mycorhization. En revanche, l'inoculation influence significativement la fréquence de la mycorhization pour le sol traité par biopile ( $p \leq 0,01$ ) et pour le sol traité par désorption thermique ( $p \leq 0,001$ ). La fertilisation a, quant à elle, un effet significatif uniquement sur le sol traité par désorption thermique ( $p \leq 0,05$ ).

L'intensité de la colonisation mycorhizienne est très homogène dans le sol non traité (environ 20%). Les résultats sont plus variables dans les sols traités (0 à 40%). L'intensité de la mycorhization est influencée par le traitement du sol (tableau 29), le sol traité par désorption thermique étant significativement différent des deux autres sols ( $p \leq 0,001$ ).

L'inoculation et la fertilisation n'ont pas d'effet sur l'intensité de la mycorhization pour le sol non traité. En revanche, l'inoculation augmente significativement l'intensité de colonisation dans les sols traités par biopile et par désorption thermique (respectivement,  $p \leq 0,001$  et  $p \leq 0,05$ ). La fertilisation a un effet significatif uniquement sur le sol traité par biopile ( $p \leq 0,05$ ).

La teneur en arbuscules estimée sur la partie mycorhizée ou sur l'ensemble du système racinaire (tableau 29) montre aussi des différences significatives entre le sol traité par désorption thermique et les deux autres sols ( $p \leq 0,05$ ). Le sol traité par biopile non inoculé présente des teneurs en arbuscules plus faibles (29 à 41%) que le sol non traité, mais plus élevées que dans le sol traité par désorption thermique (0 à 12%).

Pour le sol non traité, les teneurs en arbuscules sont assez homogènes (autour de 50% de la partie mycorhizée) et l'inoculation et la fertilisation n'ont pas d'effet sur ces paramètres. En revanche, l'inoculation mycorhizienne conduit à une augmentation significative de la teneur en arbuscules pour le sol traité par biopile ( $p \leq 0,01$ ) et pour le sol traité par désorption thermique ( $p \leq 0,05$ ). La fertilisation n'a pas d'effet significatif sur chacun de ces trois sols. Cependant, les valeurs les plus élevées sont obtenues dans le cas d'une inoculation associée à une fertilisation pour les sols traités (60 à 70% de la partie mycorhizée).

Le nombre de nodosités sur les racines (tableau 29) est significativement ( $p \leq 0,01$ ) plus élevé dans le sol non traité (de 75 à 197,5 en fonction des modalités) que dans les deux autres sols, pour lesquels leur nombre est beaucoup plus faible en particulier dans les modalités non inoculées (5 à 8). L'inoculation mycorhizienne augmente significativement le nombre de nodosités pour le sol non traité ( $p \leq 0,05$ ) et pour le sol traité par biopile ( $p \leq 0,01$ ) et tend à l'augmenter pour le sol traité par désorption thermique, mais la différence n'est pas significative. La fertilisation a un effet significatif uniquement pour le sol non traité ( $p \leq 0,05$ ).

PARTIE III - Chapitre II

Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt

**Tableau 29: Paramètres de mycorhization et nombre de nodosités dans les racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.**

Les erreurs standard sont données pour n=4. Les analyses statistiques sont réalisées sur le paramètre sol (S) par ANOVA à trois niveaux, et pour chaque sol sur les paramètres inoculation (I) et fertilisation (F) par ANOVA à deux niveaux. Les différences significatives sont données, pour le paramètre S, par deux lettres distinctes et sont précisées, pour l'ensemble des paramètres, avec \* : p≤0,05, \*\* : p≤0,01, \*\*\* : p≤0,001 et n.s : effet non significatif.

		Mycorhization		Teneur en arbuscules		Nombre de nodosités par pot
		Fréquence (F) en %	Intensité (M) en %	partie mycorhizée (a) en %	système racinaire (A) en %	
Sol non traité	NI/NF	98,3 ±1,3	24,5 ±6,0	51,6 ±12,9	14,9 ± 8,3	74,8 ± 6,2
	NI/F	97,5 ±1,3	22,0 ±4,1	43,5 ±4,9	7,6 ± 0,9	161,3 ± 5,1
	I/NF	100,0 ±0,0	20,0 ±5,6	48,0 ±5,5	10,6 ± 4,3	157,0 ± 25,8
	I/F	99,2 ±0,6	25,2 ±3,6	55,0 ±5,1	14,0 ± 3,2	197,5 ± 19,3
	ANOVA I	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*
	ANOVA F	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*
	IxF	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Sol biopile	NI/NF	35,8 ±7,9	8,9 ±1,5	28,7 ±10,8	1,4 ± 0,7	7,8 ± 3,6
	NI/F	61,7 ±9,6	12,1 ±3,9	41,1 ±6,3	4,3 ± 1,9	7,8 ± 1,1
	I/NF	87,5 ±3,8	24,8 ±0,7	57,7 ±6,9	13,7 ± 1,9	100,5 ± 14,0
	I/F	81,7 ±2,5	40,8 ±4,6	72,6 ±7,5	30,0 ± 6,3	74,5 ± 26,4
	ANOVA I	**	***	**	***	**
	ANOVA F	n.s.	*	n.s.	*	n.s.
	IxF	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Sol traité	NI/NF	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	8,0 ± 2,0
	NI/F	5,8 ±1,5	0,1 ±0,0	12,5 ±12,5	0,0 ± 0,0	4,8 ± 1,4
	I/NF	28,3 ±8,8	6,8 ±2,8	37,1 ±22,2	2,5 ± 1,4	22,3 ± 8,9
	I/F	69,2 ±9,6	22,5 ±5,6	61,8 ±6,2	13,2 ± 5,8	14,8 ± 2,6
	ANOVA I	***	**	*	*	n.s.
	ANOVA F	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	IxF	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>ANOVA</b>		S ***	S ***	S *	S *	S **
Sol non traité		a	a	a	a	a
Sol traité biopile		b	a	a	a	b
Sol traité désorption thermique		c	b	b	b	c

2.3.1.2. Analyse moléculaire de la mycorhization

Le gel d'acrylamide obtenu par les techniques de PCR-TTGE sur l'ADN 18S des racines des luzernes après 56 jours de culture présenté dans la figure 28 synthétise l'ensemble des profils différents observés lors de cette expérience. Les gels complets pour chaque modalité sont présentés en annexe 2.

## PARTIE III - Chapitre II

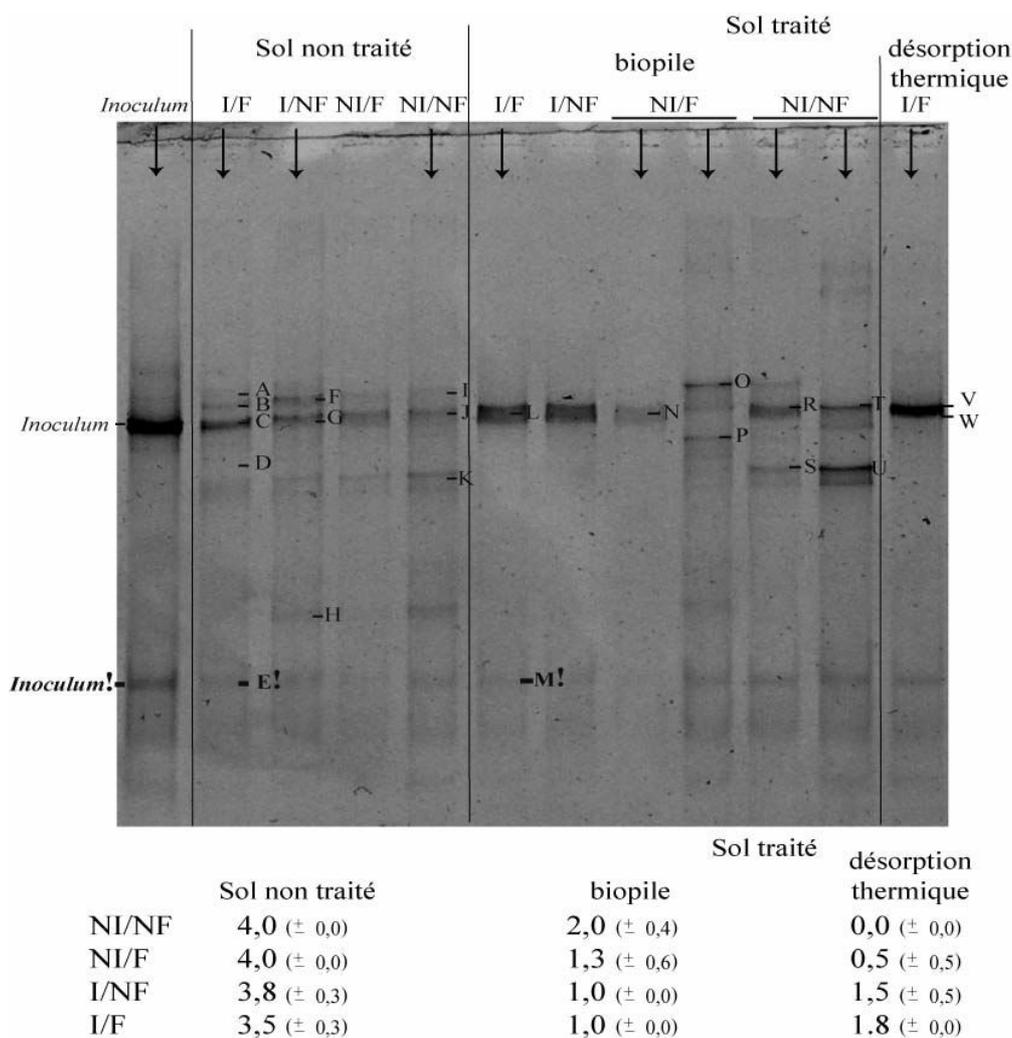
### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt

Le champignon mycorhizien inoculé lors de cette expérience a également été analysé par les techniques de PCR-TTGE. Le séquençage de la bande ainsi obtenue sur le gel de TTGE montre sa proximité phylogénétique avec *Glomus intraradices* et *Glomus fasciculatum* (bande inoculum) (figure 29). Pour l'inoculum et pour certains échantillons, une bande à la partie inférieure du gel a été observée (figure 28). Les bandes « inoculum! », « E! » et « M! » ont été analysées par séquençage et semblent être des artefacts dus aux techniques utilisées. En effet, elles apparaissent comme des bandes chimères, ne correspondant pas à une séquence d'ADN existante et seraient dues à la formation d'hétéroduplex. Ces bandes n'ont donc pas été prises en compte pour déterminer le nombre de bandes obtenues pour chaque échantillon.

Pour le sol non traité (figure 28 et annexe 2), l'ensemble des échantillons, qu'ils soient inoculés ou non par *Glomus intraradices*, présente des profils de bandes de TTGE très voisins. Le nombre de bandes (espèces) observées (figure 28) est aussi homogène pour l'ensemble des échantillons de ce sol. Du reste, le sol non traité comptabilise le maximum de bandes en comparaison avec les sols traités. L'analyse par séquençage des bandes obtenues sur le gel de TTGE pour le sol non traité (figure 29) montre qu'elles appartiennent au genre *Glomus*, pour la plupart (bandes A à J) à un groupe phylogénétique proche de *Glomus intraradices* et *Glomus fasciculatum* et proche de *Glomus* sp. pour la bande K.

Le sol traité par biopile contient moins d'espèces que le sol non traité (figure 28 et annexe 2) et présente des profils différents entre les modalités inoculées et non inoculées. L'inoculation conduit à un profil identique pour toutes les répétitions des modalités fertilisées ou non. La seule bande obtenue pour les modalités inoculées montre une proximité phylogénétique avec *Glomus intraradices* et *Glomus fasciculatum*. Les modalités non inoculées, quant à elles, donnent des profils hétérogènes et plus diversifiés. L'analyse par séquençage des bandes obtenues sur le gel de TTGE pour les modalités non inoculées du sol traité par biopile (figure 29) montre qu'elles appartiennent pour la plupart (bandes O, P, Q, T, U) à un groupe phylogénétique proche de *Glomus mosseae* tandis que les autres bandes (L, N, R et S) sont proches de *Glomus intraradices* et *Glomus fasciculatum*.

Pour le sol traité par désorption thermique, un seul profil a été obtenu (figure 28), et le nombre de bandes est très faible et même nul pour la modalité NI/NF et trois répétitions de la modalité N/IF. L'analyse des bandes obtenues par TTGE (bandes V et W), qui sont au même niveau de migration sur le gel que la bande de l'inoculum, montre également une proximité phylogénétique avec *Glomus intraradices* et *Glomus fasciculatum* (figure 29).



**Figure 28 :** Gel de TTGE montrant les différents profils obtenus par les techniques de PCR-TTGE sur l'ADN 18S dans les racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.

Les échantillons analysés sont indiqués par des flèches et les bandes séquencées sont indiquées par des traits et des lettres différentes.

### 2.3.2. Structure des communautés microbiennes dans le sol

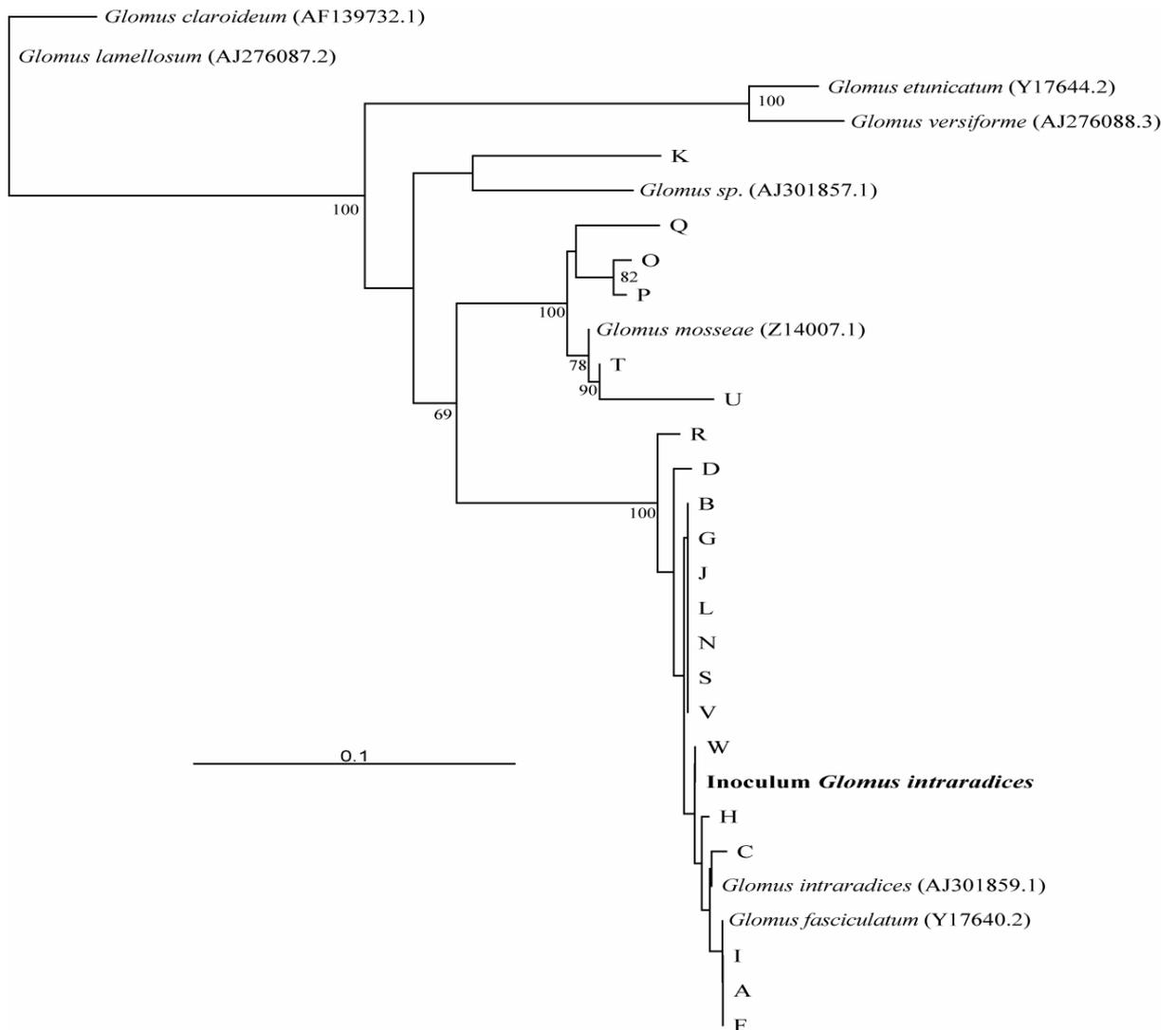
#### 2.3.2.1. Analyse moléculaire des communautés bactériennes

Le nombre total de bandes obtenues pour le sol non traité est d'environ 80 quelle que soit la modalité considérée, tandis qu'il est compris entre 37 et 56 pour le sol traité par biopile et compris entre 31 et 87 pour le sol traité par désorption thermique (tableau 30).

L'analyse par ACP des profils des communautés bactériennes obtenus par TTGE montre une discrimination nette des profils de communautés des différents sols autour des deux axes principaux qui expliquent respectivement 40 et 27% de la variance (figure 30). Le premier axe semble séparer le sol non traité des sols traités, tandis que le deuxième axe montre l'effet des modalités.

## PARTIE III - Chapitre II

### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt



**Figure 29 : Arbre phylogénétique basé sur des alignements des séquences de l'ADNr 18S pour les champignons mycorhiziens présents dans les racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.**

L'analyse par neighbor joining montre la position des séquences correspondant aux bandes de TTGE analysées (figure 4) vis-à-vis de différentes espèces de *Glomus* référencées dans Genbank et choisies d'après l'arbre phylogénétique global des champignons mycorhiziens (Schwarzott *et al.*, 2001). L'arbre a été ancré avec la séquence de l'espèce *Glomus lamellosum* (AJ276087.2). L'échelle représente 10% de variation de séquence et les valeurs de bootstrap de l'analyse (n=100) sont indiquées lorsqu'elles sont supérieures à 60%. Les numéros d'accèsion des champignons de références sont donnés entre parenthèse.

Les communautés bactériennes du sol non traité sont regroupées de façon homogène sur l'ACP. Ces bactéries constituent ainsi un groupe stable, quel que soit la modalité. Ce groupe n'est pas influencé par l'inoculation ni par la fertilisation.

Les communautés bactériennes du sol traité par biopile se trouvent également assez groupées sur l'ACP, mais pour ce sol les différents traitements se distinguent entre eux. L'inoculation permet de distinguer les communautés bactériennes selon deux groupes (traitements inoculés et non inoculés). La fertilisation ne permet pas de distinction de groupe.

## PARTIE III - Chapitre II

### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt

Les communautés bactériennes du sol traité par désorption thermique sont davantage réparties sur l'ACP. L'inoculation mycorhizienne conduit à une discrimination des communautés en deux groupes (modalités inoculées et non inoculées), sauf pour deux répétitions de la modalité I/NF. Ainsi les communautés des modalités non inoculées forment un groupe homogène où la fertilisation n'a pas d'impact, tandis que les traitements inoculés semblent se distinguer.

Pour la modalité non inoculée et non fertilisée, l'indice de diversité de Shannon-Weaver (tableau 30) est plus élevé pour le sol non traité (en moyenne  $H' = 4,3$ ) et pour le sol traité par désorption thermique ( $H' = 4,4$ ), que pour le sol traité par biopile ( $H'$  de 3,4 et de 3,7). L'inoculation semble avoir augmenté l'indice de diversité du sol traité par biopile mais la fertilisation ne semble pas l'avoir influencé.

Pour le sol traité par désorption thermique, l'indice de Shannon-Weaver est plus faible pour la modalité inoculée et fertilisée ( $H' = 3,20$ ) que pour les autres. Les traitements non inoculés ont des indices identiques ( $H'$  environ 4,44).

L'indice de diversité de Simpson (tableau 30) pour les communautés bactériennes du sol ne montre aucune différence entre les quatre modalités du sol non traité ( $\lambda = 0,4$ ), mais plus de variations entre les modalités des sols traités. La diversité rencontrée dans le sol traité par désorption thermique est moins importante ( $\lambda = 0,02$ ) que dans les autres sols.

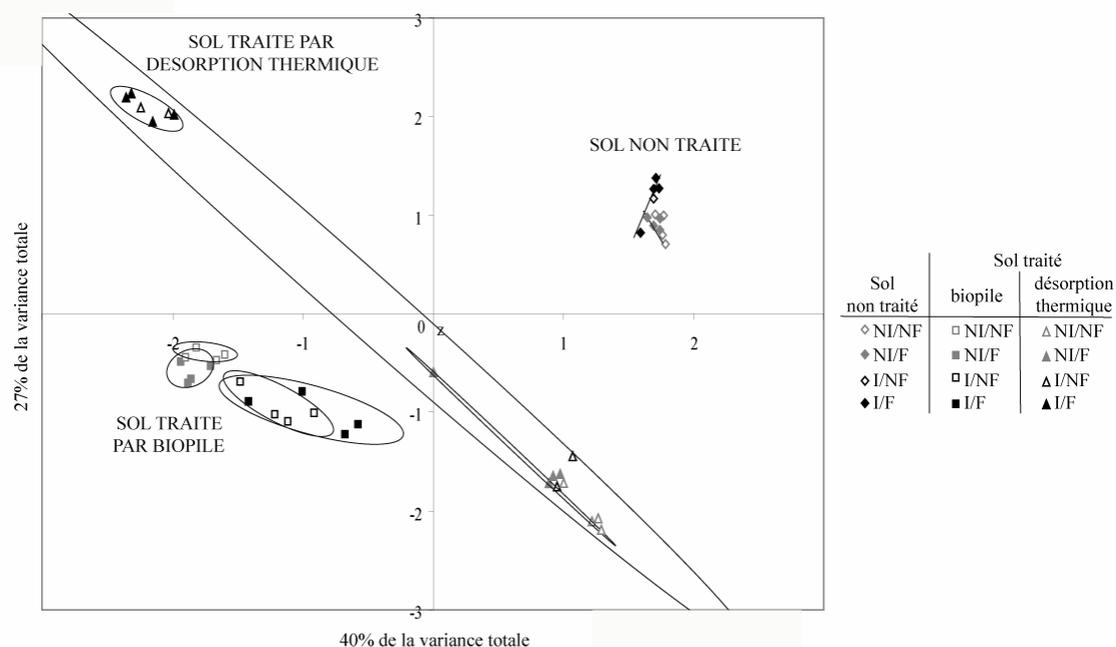
Pour le sol traité par biopile, l'indice de Simpson est identique pour les deux traitements inoculés ( $\lambda = 0,05$ ) et est plus faible que pour les traitements non inoculés ( $\lambda$  de 0,06 à 0,08).

Les indices de Simpson dans le sol traité par désorption thermique présentent une valeur plus importante pour la modalité inoculée et fertilisée ( $\lambda = 0,08$ ). Les valeurs des autres modalités sont assez proches entre elles.

Pour les trois sols, l'indice de Shannon-Weaver et l'indice de Simpson ont des valeurs proches montrant ainsi peu de différence entre les diversités bactériennes des trois sols.

## PARTIE III - Chapitre II

### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt



**Figure 30 : Analyse en composante principale (ACP) des profils des communautés bactériennes obtenus par TTGE dans le sol rhizosphérique de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.**

Les ellipses statistiques correspondent à un intervalle de confiance de 90%.

**Tableau 30 : Indices de diversité des communautés bactériennes et nombre de bandes moyen obtenu par TTGE dans le sol rhizosphérique de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.**

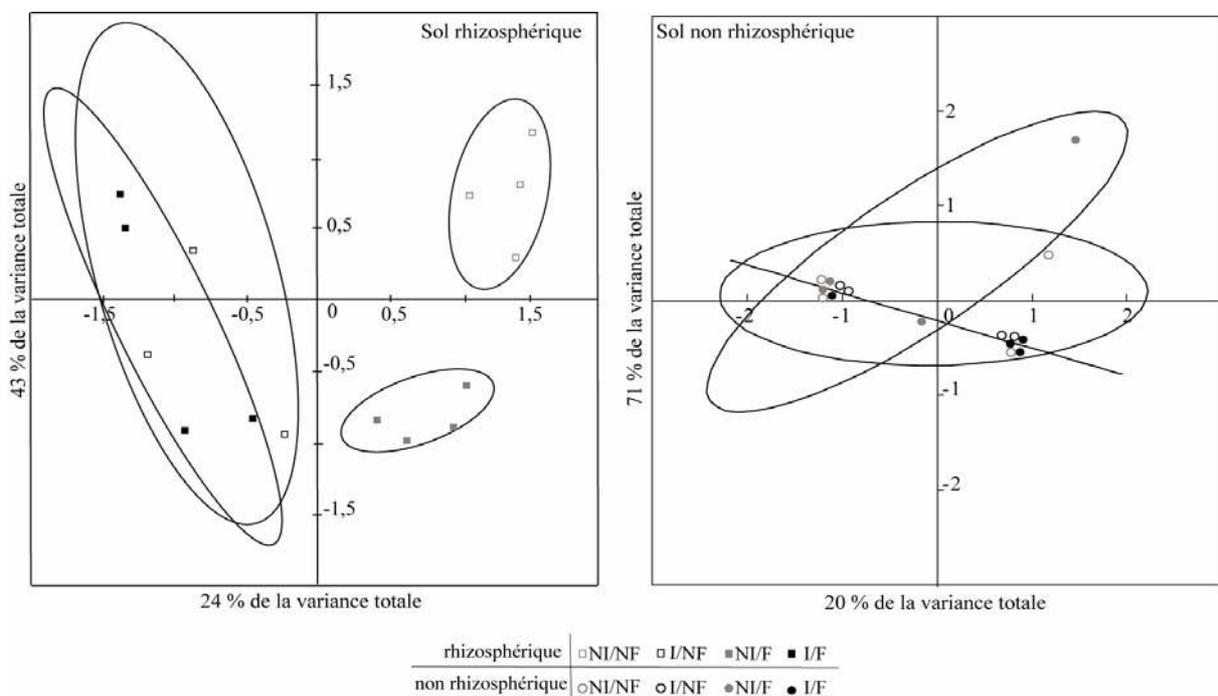
Les erreurs standard sont données pour n=4.

		Indice de Shannon-Weaver H'	Indice de Simpson $\lambda$	Nombre moyen de bandes (TTGE)	
Sol non traité	NI/NF	4,36	0,04	20,3 $\pm$ 0,3	
	NI/F	4,32	0,04	20,0 $\pm$ 0,0	
	I/NF	4,39	0,04	21,0 $\pm$ 0,0	
	I/F	4,43	0,04	21,2 $\pm$ 0,3	
Sol traité	biopile	NI/NF	3,72	0,06	12,0 $\pm$ 0,7
		NI/F	3,37	0,08	9,3 $\pm$ 0,3
		I/NF	4,00	0,05	13,3 $\pm$ 1,0
	désorption thermique	I/F	4,01	0,05	14,0 $\pm$ 1,3
Sol traité	désorption thermique	NI/NF	4,46	0,03	21,8 $\pm$ 0,3
		NI/F	4,42	0,03	19,0 $\pm$ 2,0
		I/NF	4,76	0,02	15,0 $\pm$ 3,2
		I/F	3,20	0,08	7,8 $\pm$ 1,0

## PARTIE III - Chapitre II

### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt

Les analyses par ACP séparées de chacun des trois sols donnent des résultats contrastés puisque la diversité du sol non traité et traité par désorption thermique est trop faible pour permettre de discriminer suffisamment les espèces. En revanche, pour le sol traité par biopile (figure 31), il est possible de distinguer les modalités de traitement. La figure 31 présente les analyses en composantes principales des sols rhizosphériques et non rhizosphériques du traitement par biopile. Ces deux fractions de sol se distinguent par le nombre total de bactéries rencontrées (respectivement 231 et 194 bandes différentes pour le sol non rhizosphérique et 17 et 21 bandes différentes pour le sol rhizosphérique, résultats non présentés). Pour le sol rhizosphérique, l'ACP permet de discriminer les modalités inoculées des modalités non inoculées selon l'axe des ordonnées supportant 24% de la variance. Le paramètre fertilisation permet de discriminer nettement les modalités non inoculées selon l'axe des abscisses (43% de la variance), mais ceci n'est pas observé pour les modalités inoculées. L'analyse en composantes principales du sol non rhizosphérique ne permet pas de distinguer de différences entre les communautés bactériennes des différentes modalités. Le sol traité par biopile présente ainsi des profils distincts qui montrent un effet de la rhizosphère sur la diversification des communautés bactériennes.



**Figure 31 : ACP des profils des communautés bactériennes obtenus par TTGE dans le sol rhizosphérique et le sol non rhizosphérique de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt traité par biopile.**

Les ellipses statistiques correspondent à un intervalle de confiance de 90%.

## PARTIE III - Chapitre II

### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt

#### 2.3.2.2. *Analyse moléculaire des communautés fongiques*

Le nombre total de bandes obtenues pour le sol non traité est compris entre 48 et 76, tandis qu'il est compris entre 32 et 109 pour le sol traité par biopile et entre 0 et 36 pour le sol traité par désorption thermique (nombres moyens donnés dans le tableau 31).

Comme pour les communautés bactériennes, les profils des communautés fongiques des trois sols obtenus par TTGE apparaissent très discriminés sur l'analyse ACP (figure 32). Le premier axe (28% de la variance) semble séparer le sol non traité des sols traités, tandis que le deuxième axe (22% de la variance) montre l'effet des modalités.

De la même manière que pour les communautés bactériennes, les communautés fongiques du sol non traité sont très groupées sur l'ACP, quelle que soit la modalité.

Les différentes communautés fongiques du sol traité par biopile se trouvent réparties dans la même zone sur l'ACP. La combinaison de l'inoculation et de la fertilisation conduit à une discrimination des communautés fongiques. Pour le traitement inoculé et non fertilisé, l'ensemble des répétitions se regroupent dans un ensemble nettement différent du traitement inoculé et fertilisé mais semblent proche du traitement non inoculé et fertilisé. Pour les traitements non inoculés la fertilisation ne permet pas de discriminer les communautés fongiques. Les communautés fongiques du sol traité par désorption thermique sont regroupées de façon homogène sur l'ACP et leur structure n'est pas influencée par l'inoculation et/ou la fertilisation.

L'indice de diversité de Shannon-Weaver pour les communautés fongiques du sol (tableau 31) est équivalent pour le sol non traité et celui traité par biopile pour la modalité non inoculée et non fertilisée. Pour ces deux sols, l'inoculation et la fertilisation augmentent la valeur de cet indice de diversité.

Pour le sol traité par désorption thermique, l'indice de Shannon-Weaver est plus faible pour la modalité inoculée et non fertilisée ( $H' = 2,82$ ) que pour la modalité inoculée et fertilisée ( $H' = 3,17$ ), soulignant l'effet de la fertilisation sur la diversité fongique. Les traitements non inoculés n'ont pas de valeur d'indices car ils sont exempts de champignons.

L'indice de diversité de Simpson pour les communautés fongiques du sol non traité et du sol traité par biopile (tableau 31) semble diminuer sous l'effet de l'inoculation.

Dans le sol traité par désorption thermique, l'indice de Simpson est identique pour les traitements inoculés et est plus élevé que dans les deux autres sols.

Pour les trois sols, l'indice de Shannon-Weaver et l'indice de Simpson montrent des différences entre les sols résultant d'une diversité fongique dépendante du traitement du sol

PARTIE III - Chapitre II

Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt

(indice plus important pour le sol traité par biopile et plus faible dans le sol traité par désorption thermique).

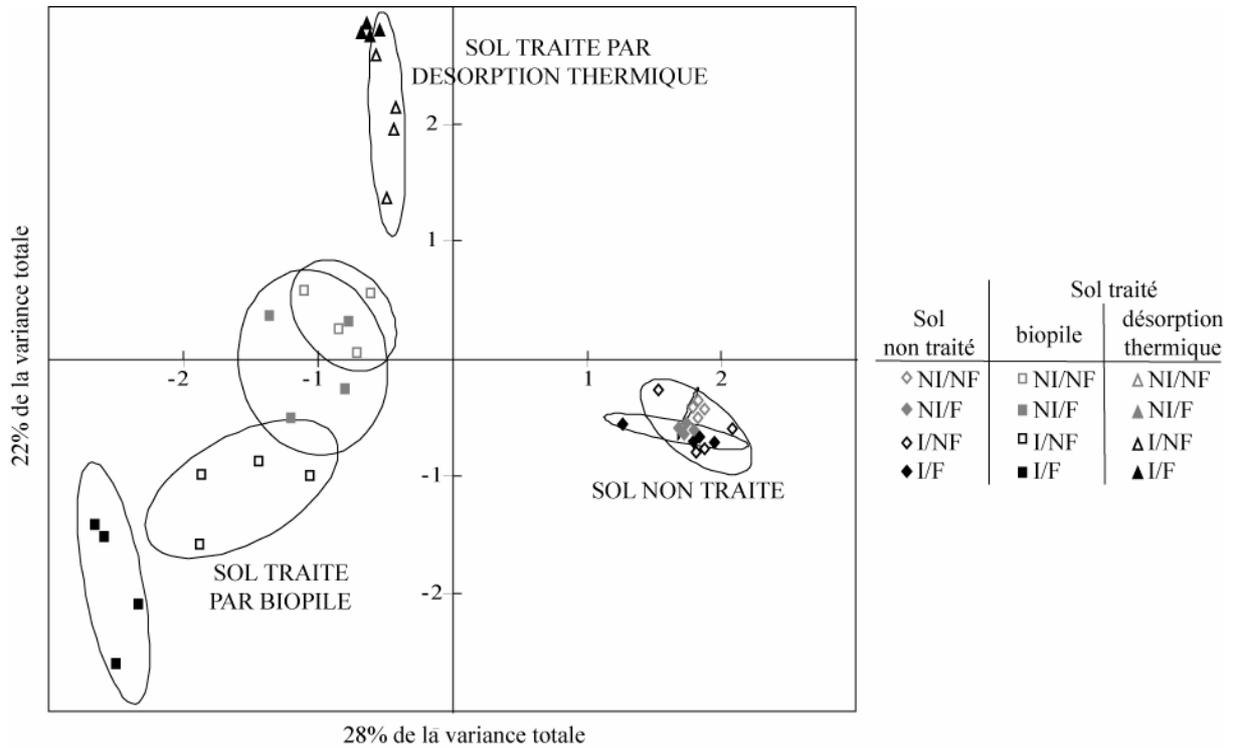


Figure 32 : ACP des profils des communautés fongiques obtenus par TTGE dans le sol rhizosphérique de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.

Les ellipses statistiques correspondent à un intervalle de confiance de 90%. Les traitements non inoculés du sol traité par désorption thermique ne sont pas représentés car ils sont exempts de champignons.

Tableau 31 : Indices de diversité des communautés fongiques et nombre de bandes moyen obtenu par TTGE dans le sol rhizosphérique de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.

Les erreurs standard sont données pour n=4.

		Indice de Shannon-Weaver H'	Indice de Simpson λ	Nombre moyen de bandes (TTGE)
Sol non traité	NI/NF	3,58	0,06	12,0 ± 0,0
	NI/F	3,87	0,05	12,8 ± 0,5
	I/NF	4,25	0,04	16,3 ± 0,9
	I/F	4,64	0,03	19,0 ± 1,7
Sol traité biopile	NI/NF	3,52	0,07	8,0 ± 1,0
	NI/F	4,12	0,04	9,8 ± 1,9
	I/NF	4,56	0,03	16,0 ± 1,8
	I/F	5,26	0,02	27,3 ± 3,0
Sol traité désorption thermique	NI/NF	-	-	0,0 ± 0,0
	NI/F	-	-	0,0 ± 0,0
	I/NF	2,82	0,10	3,8 ± 1,7
	I/F	3,17	0,09	9,0 ± 0,0

## 2.4. DEVENIR DES POLLUANTS

### 2.4.1. Teneur en HAP dans le sol après culture

L'analyse statistique montre que les teneurs en HAP (pour 16 HAP) sont significativement influencées par le traitement du sol ( $p \leq 0,001$  pour le sol non rhizosphérique et  $p \leq 0,01$  pour le sol rhizosphérique) (figure 33). Pour les trois sols et quelles que soient les modalités, les teneurs en HAP en fin d'expérience sont plus faibles que les teneurs initiales. Pour le sol non traité et le sol traité par biopile, la concentration des HAP est significativement différente entre les sols rhizosphériques et non rhizosphériques ( $p \leq 0,001$  et  $p \leq 0,05$ ). Ainsi, la teneur en HAP est plus faible dans le sol non traité non rhizosphérique pour les modalités NI/NF, NI/F, I/NF, mais c'est l'inverse pour la modalité I/F. L'analyse de l'ensemble des données pour le sol traité par biopile montre une plus faible concentration de HAP dans le sol non rhizosphérique. Pour le sol traité par désorption thermique, il n'y a pas de différence significative entre le sol rhizosphérique et le non rhizosphérique.

La fertilisation a un effet significatif ( $p \leq 0,05$ ) sur la teneur en HAP dans le sol non traité. Cette teneur est plus élevée pour la modalité fertilisée dans le sol rhizosphérique. La fertilisation a l'effet inverse pour le sol rhizosphérique de la modalité inoculée.

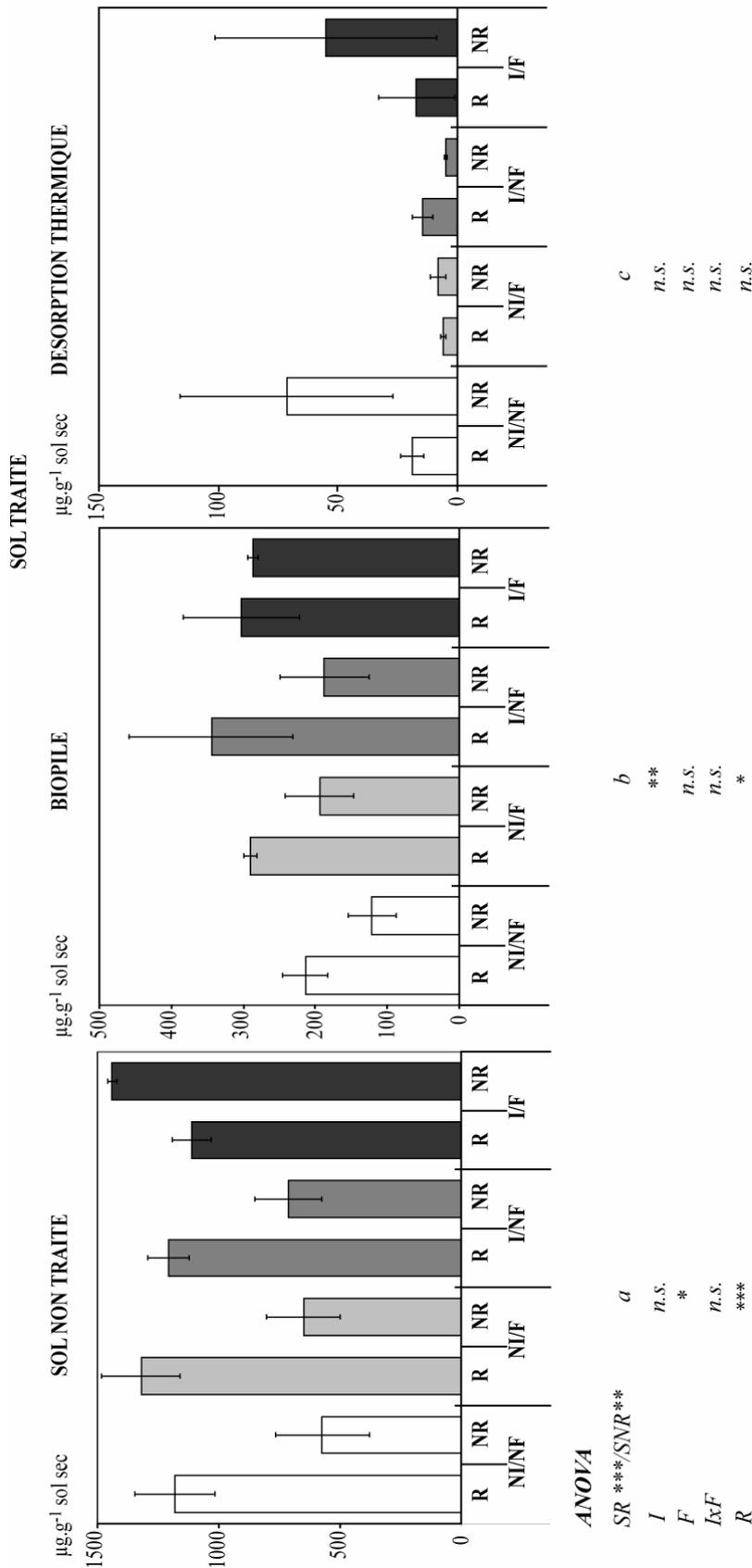
Pour le sol traité par biopile, quelle que soit la portion de sol étudiée, toutes les modalités inoculées ont des teneurs en HAP plus importantes ( $p \leq 0,05$ ).

Pour le sol traité par désorption thermique, l'inoculation et la fertilisation n'influence pas les teneurs en HAP.

Les trois sols se distinguent selon la répartition des HAP (figure 34). Le sol non traité est constitué à 60-65 % d'HAP à 3 cycles benzéniques (acénaphthylène, acénaphtène, fluorène, phénanthrène, anthracène), environ 30 % de composés à 4 cycles (fluoranthène, pyrène, benzo[a]anthracène, chrysène) et 5 à 10 % de composés à 5 cycles (benzo[b,k]fluoranthène, benzo[a]pyrène), et on note peu de différences entre les modalités et entre les sols rhizosphériques et non rhizosphériques. En revanche, dans le sol traité par biopile les HAP à 3 cycles représentent 5 à 25 % du total, ceux à 4 cycles 60 à 75 % et les composés à 5 cycles 15 à 35%, et des différences apparaissent entre les modalités. Pour les modalités non inoculées et la modalité inoculée non fertilisée, les sols rhizosphériques montrent des pourcentages plus faibles de HAP légers (3 cycles) et plus élevés de composés lourds (5 cycles) que les sols non rhizosphériques. Cette différence n'est pas observée pour la modalité inoculée et fertilisée, pour laquelle c'est dans le sol rhizosphérique que le pourcentage de HAP à 3 cycles est le plus élevé.

PARTIE III - Chapitre II

Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt



**Figure 33 : Teneur de l'ensemble des HAP dans le sol rhizosphérique et non rhizosphérique de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.**

Les barres présentent les erreurs standard (n=4). Pour l'ensemble des sols, les analyses statistiques sont réalisées par ANOVA à trois niveaux sur les données du sol rhizosphérique (SR) et du sol non rhizosphérique (SNR), et pour chaque sol sur les paramètres inoculation (I), fertilisation (F) et rhizosphère (R). Les différences significatives sont données, pour le paramètre S (SR et SNR), par deux lettres distinctes et sont précisées, pour l'ensemble des paramètres, avec \* : p≤0,05, \*\* : p≤0,01, \*\*\* : p≤0,001 et n.s. : effet non significatif.

PARTIE III - Chapitre II

Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt

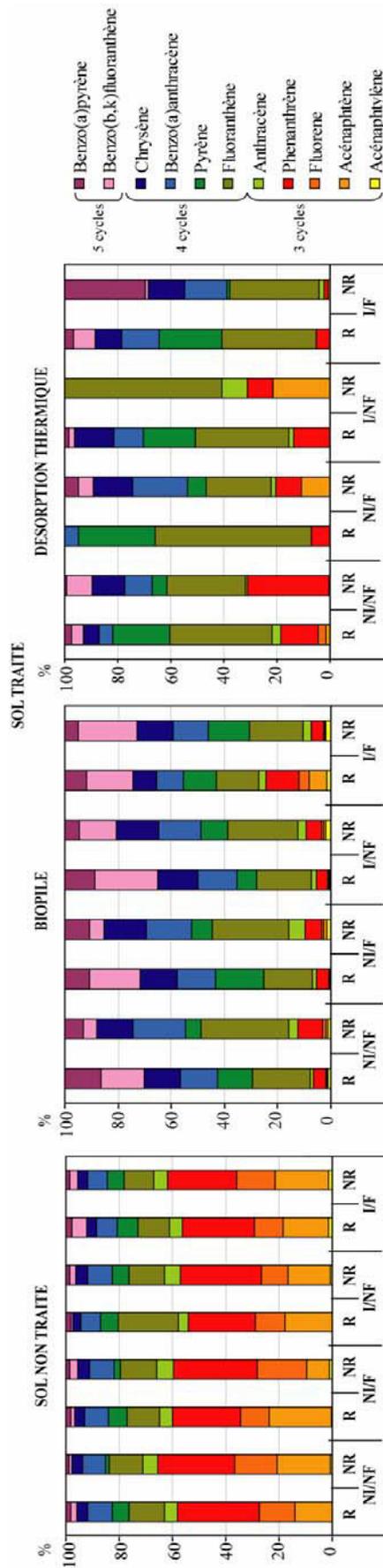


Figure 34 : Répartition de l'ensemble des HAP dans le sol rhizosphérique et non rhizosphérique de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.

## PARTIE III - Chapitre II

### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt

Dans le sol traité par désorption thermique, on observe une grande variabilité dans les pourcentages relatifs des différents HAP entre les sols rhizosphériques et non rhizosphériques, et entre les modalités. Ainsi les composés à 3 cycles représentent 5 à 40 % du total, ceux à 4 cycles 60 à 95 % et les composés à 5 cycles 0 à 35%.

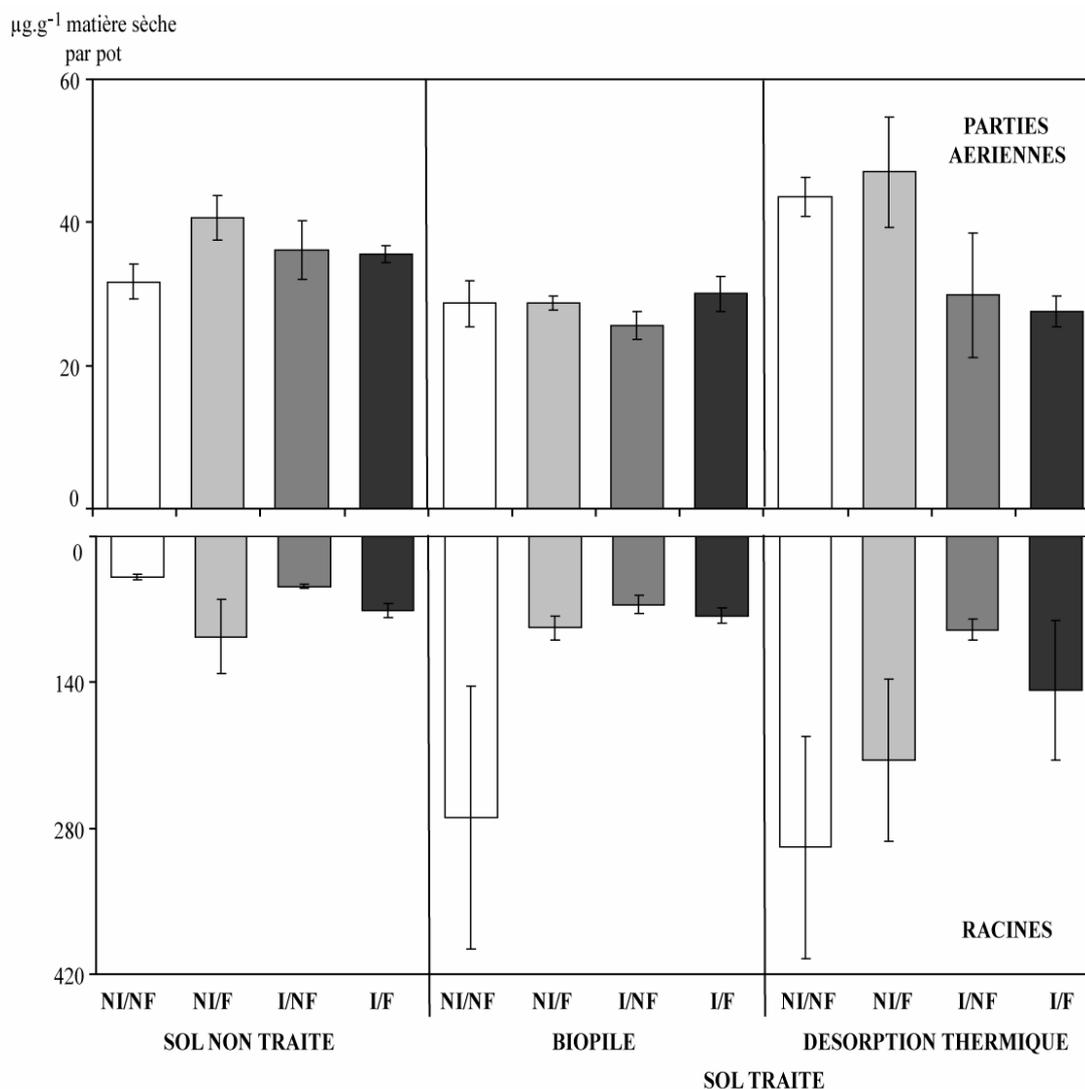
#### **2.4.2. Teneur en zinc dans les plantes**

L'analyse statistique montre que la teneur en zinc des parties aériennes et des racines de la luzerne (figure 35) est significativement influencée par le traitement du sol ( $p \leq 0,05$ ). Le sol traité par biopile présente ainsi des teneurs en zinc significativement différentes de celles rencontrées dans les deux autres sols. Le sol traité par désorption thermique présente la plus forte teneur en zinc dans les racines et le sol non traité la plus faible (figure 35).

Pour le sol non traité, la fertilisation a augmenté ( $p \leq 0,05$ ) la teneur en zinc des racines mais n'a pas eu d'effet sur celle des parties aériennes. Pour le sol traité par biopile, l'inoculation et la fertilisation n'ont pas influencé la teneur en zinc. En revanche, l'inoculation mycorhizienne a diminué significativement ( $p \leq 0,05$ ) la teneur en zinc des parties aériennes pour le sol traité par désorption thermique. La même tendance est observée dans les racines, mais la différence n'est pas significative.

## PARTIE III - Chapitre II

### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt



#### ANOVA

Parties aériennes	S **	a	b	a
Racines	S *	a	ab	b
Parties aériennes	I	n.s.	n.s.	*
	F	n.s.	n.s.	n.s.
	IxF	n.s.	n.s.	n.s.
Racines	I	n.s.	n.s.	n.s.
	F	*	n.s.	n.s.
	IxF	n.s.	n.s.	n.s.

**Figure 35 : Teneur en zinc dans les parties aériennes et les racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.**

Les barres présentent les erreurs standard ( $n=4$ ). Pour l'ensemble des sols, les analyses statistiques sont réalisées sur le paramètre sol (S) par ANOVA à trois niveaux, et sur chaque sol sur les paramètres inoculation (I) et fertilisation (F) par ANOVA à deux niveaux. Les différences significatives sont données, pour le paramètre S, par deux lettres distinctes et sont précisées, pour l'ensemble des paramètres, avec \* :  $p \leq 0,05$ , \*\* :  $p \leq 0,01$  et n.s. : effet non significatif.

### 3. DISCUSSION

#### 3.1. CROISSANCE DES PLANTES ET NUTRITION MINERALE

##### 3.1.1. Influence des différents sols

Dans cette étude en vase de végétation, c'est dans le sol non traité que la survie et la croissance de la luzerne étaient les plus élevées malgré la présence de contaminants organiques et métalliques. En l'absence de sol témoin non contaminé, il n'est pas possible de conclure quant à un éventuel effet du sol non traité sur la croissance de la luzerne. Les traitements du sol par biopile et par désorption thermique ont, quant à eux, affecté la survie et la croissance de la luzerne, par rapport au sol non traité. Les deux sols traités ont ainsi fortement réduit la croissance de la luzerne. Le traitement par biopile a, de plus, réduit significativement le pourcentage de survie des plantes par rapport aux deux autres sols.

A notre connaissance, la croissance de plantes sur des sols traités par biopile et par désorption thermique n'a pas fait l'objet d'études antérieures, néanmoins de nombreux travaux ont porté sur des cultures de plantes, y compris de luzerne, sur des sols contaminés en HAP. Leyval et Binet (1998) ont montré que, pour le ray gras, avec un sol agricole contaminé en HAP, la survie des plantes était de 60 à 80% pour une concentration de HAP de 0,1 à 1 g.Kg<sup>-1</sup>, mais de 0% pour 5 g.Kg<sup>-1</sup> de HAP, tandis que dans le témoin non contaminé, la survie était de 100%. En présence d'un champignon mycorhizien, la survie était invariablement à 100%. Binet *et al.* (2000b) ont aussi montré une réduction de la croissance due à l'apport de HAP. Dans des expériences avec des dispositifs à compartiments, l'addition de phénanthrène (500 mg.kg<sup>-1</sup>) dans le compartiment latéral réduisait la croissance du ray grass dans le compartiment central (Corgié *et al.*, 2003). En revanche, selon certains auteurs, la contamination en HAP ne semble pas affecter la biomasse des parties aériennes de la luzerne. En effet, Reilley *et al.* (1996) ont montré, qu'après un temps de culture identique à notre étude (8 semaines), la biomasse des parties aériennes de la luzerne d'un sol contaminé en HAP (100 mg.Kg<sup>-1</sup> de pyrène et d'anthracène) n'était pas significativement différente de celles de luzerne sur sol non contaminé, tandis que la biomasse des racines était augmentée dans le sol non contaminé. Il faut toutefois souligner que les teneurs en HAP étaient assez faibles. Kirk *et al.* (2005) ont obtenu une biomasse de la luzerne de 24 mg par plantes au bout de 7 semaines, pour un sol canadien près de deux fois plus contaminé que le sol non traité d'Homécourt (6468 mg.Kg<sup>-1</sup> HAP totaux). Enfin, certains auteurs ont pu observer que pour certaines espèces végétales, l'augmentation de la teneur en HAP serait bénéfique à la croissance végétale. En effet, Fismes *et al.* (2002) ont montré que l'optimum de croissance de

## PARTIE III - Chapitre II

### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt

la pomme de terre était observé dans des sols fortement contaminés en HAP (4,6 g et 4,0 g de matière sèche par plante pour des sols contaminés avec 1263 et 2526 mg.Kg<sup>-1</sup> HAP) par rapport à des sols moins contaminés (2,8 g de matière sèche par plante pour des sols contaminés avec 4 mg.Kg<sup>-1</sup> HAP). Cette absence de toxicité est attribuée par les auteurs à la faible concentration en HAP de faible poids moléculaire (naphtalène), et donc à une toxicité qui aurait diminué avec le temps et l'évaporation des HAP les plus volatils (Sims et Overcash, 1983). Dans le cas présent, la contamination en hydrocarbures est ancienne et les HAP volatiles se retrouvent aussi en faible quantité dans le sol, ce qui pourrait expliquer leur faible toxicité et le maintien de la biomasse. Toutefois, la présence simultanée de concentrations élevées en ETM a pu aussi influencer la croissance de la luzerne.

La moins bonne croissance obtenue sur les sols décontaminés suggère également que les traitements ont modifié les conditions physico-chimiques et biologiques des sols en les rendant moins favorables à la survie (traitement par biopile) ou à la croissance des plantes. On peut supposer que l'apport de nutriments, l'apport d'oxygène et l'augmentation de la température du sol dans le traitement par biopile peuvent modifier les caractéristiques physico-chimiques du sol et modifier sa microflore. Ainsi la microflore dégradant les HAP peut être favorisée lors de ce traitement et la diversité microbienne modifiée. Par ailleurs, la dégradation des HAP peut conduire à la formation de produits intermédiaires qui sont parfois plus nocifs que la molécule initiale après activation métabolique (Gram, 1995). Par exemple, certains auteurs ont pu mettre en évidence la production d'un métabolite secondaire, l'antraquinone, résultant de l'oxydation de l'antracène en présence de champignon MA et de champignons de la pourriture blanche (Field *et al.*, 1992 ; Kotterman *et al.*, 1994 ; Bogan *et al.*, 1996 ; Cerniglia, 1997). Binet *et al.* (2001) montrent ainsi que la décroissance de la quantité d'antracène dans la rhizosphère du ray grass (sol contaminé par 5 g.Kg<sup>-1</sup> d'antracène) est associée à l'accumulation de l'antraquinone. Toutefois il n'existe pas à notre connaissance d'estimation des effets de ces produits intermédiaires sur la croissance des plantes.

Lors du traitement par désorption thermique, le chauffage du sol à 500°C tend à « stériliser » le sol qui devra rétablir un équilibre microbien. L'effet d'une telle température sur les propriétés du sol sont pour l'instant mal connues et peuvent porter sur le complexe argilo-humique, sur la rétention d'eau et sur la qualité de la matière organique. Il a ainsi été montré que la biodégradabilité de la matière organique du sol d'Homécourt était fortement

réduite après traitement par biopile et était quasiment nulle dans le sol traité par désorption thermique (Biache, 2006).

### 3.1.2. Impact de la mycorhization et de la fertilisation

La fertilisation n'a pas montré d'effet significatif sur la croissance de la luzerne pour le sol non traité et le sol traité par biopile. Elle a cependant amélioré la croissance des plantes sur le sol traité par désorption thermique. Pour ce sol, on constate que la mycorhization, à elle seule, ne suffit pas à rétablir une croissance équivalente à celle du sol non traité et que la biomasse ne peut être augmentée que sous l'effet combiné de la fertilisation et de l'inoculation. Le problème de nutrition minérale de ce sol ne peut pas être lié à la présence de HAP, qui freinerait l'absorption minérale, puisque ce traitement de décontamination élimine quasiment tous les HAP dans le sol (tableau 1, partie I synthèse bibliographique). La fertilisation permettrait de remédier, au moins pour partie, aux modifications physico-chimiques supposées du sol après traitement et permettrait ainsi de rétablir une meilleure croissance des plantes.

L'inoculation par le champignon mycorhizien *Glomus intraradices* a diminué la biomasse des parties aériennes des plantes du sol non traité tandis qu'il a amélioré la biomasse des plantes pour les sols traités par biopile et par désorption thermique. L'effet contrasté du champignon observé pour le sol non traité peut être inhérent à l'existence de communautés mycorhiziennes autochtones dans ce sol qui permet la mycorhization des racines par ces champignons indigènes, même pour le traitement non inoculé (paragraphe 3.2.1.). L'effet négatif de l'inoculation rencontré pour les analyses de biomasse pourrait laisser supposer une compétition entre les champignons mycorhiziens apportés et déjà présents, freinant ou masquant alors l'effet bénéfique de la mycorhization. Cependant il peut également exister une compétition entre la plante et le champignon mycorhizien pour la nutrition.

Joner et Leyval (2001a) ont montré que la mycorhization de *Glomus mosseae* augmentait respectivement de 100% et 30% la croissance du trèfle blanc cultivé durant 8 et 16 semaines avec du ray grass sur un sol contaminé en HAP (500 mg.Kg<sup>-1</sup> d'anthracène, 500 mg.Kg<sup>-1</sup> de chrysène et 50 mg.Kg<sup>-1</sup> de dibenz [a,h]anthracène). Binet *et al.* (2000b) n'ont pas observé d'effet significatif de la mycorhization sur la croissance de ray grass dans une culture de 40 jours en présence de *Glomus mosseae* pour des sols contaminés avec 5 g.Kg<sup>-1</sup> d'anthracène ou 1 g.Kg<sup>-1</sup> d'un mélange de 8 HAP. Toutefois, Leyval et Binet (1998) ont montré que la mycorhization était d'autant plus indispensable à la croissance des plantes que la contamination en HAP était importante. Pour ces auteurs, la dépendance à la mycorhization

du ray grass, dans le sol contaminé en HAP, allait de 24 à 48% (pour une contamination de 0,1 à 1 g.Kg<sup>-1</sup> HAP) tandis qu'elle était de -18% pour le sol témoin non contaminé.

Les champignons mycorhiziens sont connus pour améliorer la nutrition minérale des plantes, notamment l'absorption du phosphore (Curl et Truelove, 1986). Le sol traité par désorption thermique nécessite l'effet de la mycorhization et de la fertilisation, mettant en évidence là encore la nécessité de restauration biologique et nutritionnelle après un traitement thermique. Les teneurs en phosphore mesurées dans les plantes ne sont pas corrélées au pourcentage de colonisation mycorhizienne mais sont dépendantes des teneurs observées dans les sols (tableau 1, partie I synthèse bibliographique).

### 3.2. MICROFLORE RHIZOSPHERIQUE DANS LES SOLS A L'ISSUE DE LA CULTURE

#### 3.2.1. Colonisation mycorhizienne

Les paramètres de la mycorhization sont identiques quelles que soient les modalités pour le sol non traité. Les sols utilisés n'ont pas été stérilisés avant leur utilisation et des études antérieures (Perrin, 2003), ainsi que nos travaux, ont montré la présence de champignons mycorhiziens dans le sol non traité. Ainsi, la colonisation mycorhizienne dans les modalités non inoculées et l'absence d'effet de l'inoculation sur les paramètres de mycorhization du sol non traité peuvent être attribuées à la présence de champignons mycorhiziens indigènes.

Cabello (1997) montre que le pourcentage de colonisation mycorhizienne est plus important dans un sol non pollué (94% pour *Cynodon dactylon*) que dans un sol pollué avec 857 mg.Kg<sup>-1</sup> de phénanthrène et 517 mg.Kg<sup>-1</sup> de chrysène (60%). De même, si Leyval et Binet (1998) n'ont pas observé d'effet de l'ajout d'anthracène (<10g.Kg<sup>-1</sup>) sur la colonisation mycorhizienne de poireau, ils ont constaté que l'apport d'un ancien sol contaminé (8g.Kg<sup>-1</sup> de HAP totaux) réduit la colonisation mycorhizienne du poireau et du trèfle. Il n'est pas possible de conclure en l'absence de sol témoin non contaminé, mais la colonisation mycorhizienne des racines dans le sol non traité, avec une fréquence voisine de 100% ne semble pas affectée par la présence de polluants et indique (i) une absence de toxicité de ceux-ci vis-à-vis des champignons MA ou (ii) la présence de champignons adaptés.

Le sol traité par biopile dans les modalités non inoculées présente également une mycorhization ce qui indique la présence d'un ou plusieurs champignon(s) indigène(s) au vu

### PARTIE III - Chapitre II

#### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt

des valeurs observées pour les paramètres de mycorhization. Cependant, le niveau de colonisation est plus faible que dans le sol non traité, et l'inoculation par *Glomus intraradices* augmente le taux de colonisation. Dans le sol traité par désorption thermique, en revanche, la colonisation mycorhizienne est quasiment inexistante dans les modalités non inoculées. Ainsi, le pouvoir mycorhizogène du sol est fortement réduit après les traitements de décontamination, en raison de la forte température appliquée pendant le traitement par désorption thermique.

Les traitements par biopile et par désorption thermique réduisent les propriétés biologiques des sols tant au niveau fongique que bactérien. Il est cependant à noter que les sols traités par biopile et par désorption thermique contiennent une pollution résiduelle (i) en HAP pour le traitement par biopile et (ii) en éléments en trace métalliques pour les deux sols traités.

Un grand nombre de travaux ont été réalisés sur l'influence des métaux sur les champignons MA (Leyval et Joner, 2001). Certains auteurs montrent une réduction de la colonisation sous l'effet des teneurs élevées en métaux (Gadd, 1993 ; Giller *et al.*, 1998). Par exemple, Weissenhorn et Leyval (1995) ont montré que la mycorhization était influencée par de fortes quantités de Zn et de Cd. Un constat identique a été fait par Koomen *et al.* (1990). Boyle et Paul (1988) ont également montré la corrélation négative entre la concentration en Zn et la colonisation mycorhizienne. Vandenkoornhuyse (1999), dans le cas d'un amendement fortement contaminé en métaux, montre que le nombre de champignons mycorhiziens ne décroît pas mais que le nombre total de spores diminue. Del Val *et al.* (1999) montrent que dans le cas d'un amendement modérément contaminé, la diversité des espèces augmente.

D'autres auteurs ne montrent pas d'effet de la teneur en métaux sur la colonisation mycorhizienne. Weissenhorn *et al.* (1995) montrent que l'apport de boues contaminées en Zn et Mn ou Cd et Ni sur un sol agricole n'a pas d'effet significatif sur la colonisation mycorhizienne. Les métaux lourds peuvent réduire voire éliminer la colonisation des plantes par les champignons MA, mais cet effet négatif n'est pas systématique.

La symbiose de champignons mycorhiziens avec les plantes dans le cas de sols pollués par des métaux permet, cependant, la protection des plantes contre la toxicité métallique et de réduire l'absorption des métaux par les plantes (Leyval *et al.*, 1997 ; Weissenhorn *et al.* 1995 ; Kaldorf *et al.*, 1999 ; Ouziad *et al.*, 2005).

### PARTIE III - Chapitre II

#### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt

Ainsi, l'effet bénéfique des champignons mycorhiziens dans cette étude pourrait, à la fois, intervenir dans la protection contre les polluants organiques, mais également contre les polluants métalliques. Il est difficile, dans notre étude, de mettre en évidence précisément les effets des champignons MA compte tenu de la pollution multiple (en différents HAP et en différents ETM). Leurs effets sur la protection contre la toxicité des HAP et des ETM peuvent se combiner tout en influençant directement la croissance des plantes par l'amélioration de la nutrition minérale et indirectement via l'amélioration de la nodulation.

Les résultats montrent que la mycorhization influence positivement la quantité de nodosités observées dans les racines. L'effet positif des champignons mycorhiziens dans l'amélioration de la nodulation et l'activité des bactéries fixatrices d'azote est bien connu (Barea *et al.*, 2005a et 2005b). L'installation combinée des deux symbioses chez les légumineuses est probablement liée à l'existence de gènes similaires modulant les deux symbioses. Le champignon MA protège la plante et les bactéries fixatrices d'azote des stress hydriques (Augé *et al.*, 2001 ; Ruiz-Lozano, 2003). Dans le cas de sols contaminés en HAP, où l'hydrophobicité des composés organiques freine l'absorption de l'eau, la présence de champignons mycorhiziens a un effet bénéfique sur le stress hydrique, non seulement des plantes, mais également sur celui des nodosités.

La quantité de nodosités est la plus importante dans le sol non traité. Elle semble plus ou moins corrélée à la présence de champignon MA dans les racines des plantes. La présence de nodosités dans la modalité non inoculée et non fertilisée dans le sol traité par désorption thermique où les plantes sont non mycorhizées montre que les bactéries fixatrices d'azote à l'origine des nodosités ne sont pas apportées par l'inoculum de *Glomus intraradices*. Là encore, les paramètres de mycorhization montrent que les traitements de remédiation affectent la mise en place de la symbiose entre les bactéries fixatrices d'azote et les racines de la luzerne. L'effet combiné de la mycorhization et de la fertilisation améliore cette symbiose dans le sol traité par désorption thermique.

L'analyse moléculaire de la mycorhization montre que le sol traité par désorption thermique présente la plus faible diversité en terme d'espèces et le sol traité par biopile la plus forte. Ceci confirme la stimulation de la microflore lors du traitement par biopile et la « stérilisation » du sol par la désorption thermique. Les sols ont été prélevés sur le site quelques mois après leurs traitements ce qui indique qu'il n'y a pas, à court terme, de recolonisation spontanée par les champignons mycorhiziens. L'inoculation réalisée tend à

réduire et à uniformiser la diversité sur le sol traité par biopile et à réinstaurer une microflore dans le sol traité par désorption thermique. Le traitement du sol par biopile semble avoir favorisé des champignons proches de *Glomus mosseae*, qui n'apparaissent pas dans le sol non traité, et qui ne sont plus observés lorsqu'il y a inoculation par *Glomus intraradices* dans le sol traité par biopile. Cependant pour le sol non traité, l'inoculation ne modifie pas les profils de champignons mycorhiziens obtenus par TTGE et n'intervient pas sur la diversité fongique de ce sol.

L'analyse des résultats de TTGE et de séquençage montre la présence d'une bande correspondant à *Glomus intraradices* dans les modalités inoculées des trois sols. Il pourrait ainsi s'agir du champignon inoculé, mais aussi d'un autre isolat du même champignon et la technique utilisée ne permet pas de conclure. Cornejo *et al.* (2004) ont montré que différents écotypes de *Glomus intraradices* donnent une bande unique de même position sur les gels de TTGE tandis que deux isolats de *Glomus viscosum* migrent selon deux bandes ayant également la même position. Cependant, un des deux isolats présente une bande additionnelle qui rend la distinction possible. Comme le suggère Kowalchuck *et al.*, (2002), l'analyse des régions variables de l'ADNr fongiques : analyse de la région 18S ou de la région 25S (Van Tuinen *et al.*, 1998) pourrait permettre d'améliorer la discrimination entre les isolats d'une même espèce.

### **3.2.2. Structure des communautés bactériennes et fongiques dans les sols à l'issue de la culture**

Marschner *et al.*, (2001) suggèrent que les **communautés bactériennes** dépendent du type de plante, de son âge et de la composition en exsudats. La structure des communautés serait également due à la composition du sol (nutriments...) (Hoffland *et al.*, 1989), sa texture, sa structure, son pH, sa matière organique, sa physico-chimie et son histoire, ainsi qu'à la colonisation mycorhizienne (Marschner *et al.*, 1997). L'analyse moléculaire des communautés bactériennes dans la rhizosphère montre une disparité de structure entre les trois sols étudiés. Le sol non traité est plus riche en nombre d'espèces, quelle que soit la modalité, que le sol traité par biopile, mais le sol traité par désorption thermique pour la modalité NI/NF présente le même nombre d'espèces. En revanche, la structure des communautés bactériennes est très différente dans les sols traités par rapport au sol non traité, et il n'y a que dans ces sols traités que l'inoculation mycorhizienne affecte significativement la structure des communautés bactériennes.

## PARTIE III - Chapitre II

### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt

Les différentes analyses de la structure des communautés bactériennes dans la rhizosphère de sols contaminés montrent des résultats variables selon les auteurs. Dans une culture de 14 semaines, Nichols *et al.* (1997) ont montré l'augmentation du nombre de microorganismes (bactéries et champignons) dans le sol rhizosphérique de la luzerne (7,97 log CFU.g<sup>-1</sup> sol pour les bactéries et 5,10 log CFU.g<sup>-1</sup> pour les champignons) par rapport au sol non rhizosphérique (7,36 log CFU.g<sup>-1</sup> sol pour les bactéries et 4,47 log CFU.g<sup>-1</sup> pour les champignons). Kirk *et al.* (2005) ont montré que la structure des communautés bactériennes était différente dans la rhizosphère par rapport au reste du sol dans une culture de 7 semaines avec de la luzerne et du ray grass sur un sol contaminé en HAP (31 g.Kg<sup>-1</sup>). Le nombre élevé des microorganismes dans le sol rhizosphérique par rapport au reste du sol peut s'expliquer par la richesse en source de carbone due aux débris cellulaires et aux facteurs de croissance, eux-mêmes dus à la présence des racines (Curl et Truelove, 1986). Cependant, Kirk *et al.* (2005) suggèrent que le peu de développement des plantes inhérent à la contamination conduit à une rhizosphère pauvre en exsudats racinaires et ainsi à une diversité des communautés bactériennes limitées. Maliszewska-Kordybach et Smreczak (2003) ont montré que la combinaison de la contamination en HAP et en métaux lourds avait plus d'effet sur les microorganismes telluriques et les plantes que les deux contaminations prises individuellement. Ainsi, les différences dans la croissance des plantes, et par voie de conséquence d'exsudation, et de teneurs en polluants peuvent expliquer ces différences dans la diversité et la structure des communautés bactériennes.

Les analyses des communautés bactériennes dans le sol non traité réalisées dans cette étude peuvent être mises en parallèle de travaux antérieurs. Joner et Leyval (2003b) ont observé un gradient spatial de dissipation des HAP de hauts poids moléculaires dans la rhizosphère du trèfle blanc sur un sol contaminé avec 2 g.Kg<sup>-1</sup> de HAP et un effet des HAP, de la présence de plantes et de champignons mycorhiziens sur la diversité bactérienne et fongique, estimée par dosage des acides gras phospholipidiques membranaires. De la même façon, Corgié *et al.* (2003) ont observé, à l'aide d'analyses moléculaires des communautés bactériennes, que la biodégradation du phénanthrène était fonction de la proximité aux racines du ray grass, et que la structure des communautés bactériennes différait avec la distance aux racines. Nos résultats confirment ainsi la structuration des communautés bactériennes par la rhizosphère, et l'influence de l'inoculation mycorhizienne sur celle-ci.

Kirk *et al.* (2005) ont noté également que les indices de Shannon Weaver pour l'ensemble des modalités (luzerne, ray grass, ray grass et luzerne, sans plantes) était

invariablement de 3,3. Les valeurs obtenues dans ce travail montrent davantage de diversité (pouvant aller jusqu'à un indice de 4,76 pour la modalité I/NF du sol traité par désorption thermique). Il est à noter que les indices de Shannon Weaver pour des sols forestiers peuvent être compris entre 2,7 et 3,8 (Staddon *et al.*, 1996).

L'analyse moléculaire des **communautés fongiques** présentes dans le sol montre, comme pour les communautés bactériennes un effet très net du traitement du sol. Les modalités ne semblent pas avoir d'effet ni sur le sol non traité ni sur le sol traité par désorption thermique mais pour des raisons différentes. Dans le premier cas, le sol non traité a une microflore anciennement établie, qui a pu atteindre une stabilité et un équilibre vis-à-vis de la pollution et dans le second cas, le sol traité par désorption thermique a une microflore qui se réinstalle après sa stérilisation. En effet, dans ce sol on n'observe pas de champignons dans les modalités non inoculées, et une relative pauvreté lorsque *Glomus intraradices* a été inoculé. Dans le sol traité par biopile, la diversité, en termes de richesse en espèces et d'indices de diversité, est plus importante en cas d'inoculation. Ainsi l'inoculation d'un champignon mycorhizien contribue à restaurer (sol traité par désorption thermique) ou augmenter (sol traité par biopile) les communautés fongiques des sols après traitement de remédiation.

### 3.3. DEVENIR DES POLLUANTS A L'ISSUE DE LA CULTURE

#### 3.3.1. Les HAP

Les analyses des HAP montrent une diminution globale des 16 HAP dans tous les sols par rapport à la teneur initiale. Cependant, dans les sols rhizosphériques et non rhizosphériques les teneurs en HAP montrent des résultats contrastés. En effet, pour le sol non traité et pour le sol traité par biopile après 56 jours de culture, la concentration des HAP dans le sol non rhizosphérique est plus faible que dans le sol rhizosphérique, tandis que c'est dans le sol rhizosphérique qu'elle est la plus faible pour la modalité inoculée et fertilisée.

Dans la littérature, l'effet des plantes sur la teneur en HAP dans le sol montre des résultats variés mais la distinction entre le sol rhizosphérique et le sol non rhizosphérique n'est pas toujours prise en compte comme elle l'a été dans cette étude. De plus, la notion de sol rhizosphérique reste difficile à délimiter, et les méthodes employées diffèrent selon les études. En effet, si Reilley *et al.* (1996) montrent que les plantes augmentent la biodégradation des HAP, ils obtiennent le sol rhizosphérique par agitation modérée des

## PARTIE III - Chapitre II

### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt

racines des plantes à la récolte dans un container. Liste et Alexander (2000a et 2000b), qui obtiennent le sol rhizosphérique en agitant les plantes pour obtenir le sol adhérent aux racines (méthode similaire à celle utilisée dans ce travail) montrent que la concentration en HAP dans un sol non planté est moins élevée que dans un sol planté. Selon ces auteurs, la proximité des racines conduit à des mouvements d'eau et d'éléments dissous. Les HAP sont alors séquestrés dans les particules hydrophobes du sol. Walton *et al.* (1994) suggèrent la stabilisation de la pollution au niveau de la rhizosphère par des processus de polymérisation (e.g. humification...). La séquestration des HAP par les plantes et les débris cellulaires pourrait contribuer à expliquer les concentrations plus importantes de HAP dans le sol rhizosphérique. Binet *et al.* (2000b) ont cependant montré que les HAP étaient peu adsorbés aux racines (0,006-0,11‰), peu absorbés dans les tissus racinaires 0,003-0,16‰) et foliaires (0,001‰) tandis que 36-66% étaient dissipés (mélange 8 HAP, 1 g.Kg<sup>-1</sup>). Sims et Overcash (1983) suggèrent que la translocation des HAP est négligeable et Reilley *et al.* (1996) montrent que seulement <0,03% des HAP initialement présents se sont accumulés dans les parties aériennes et les racines, quel que soit le traitement. Verdin *et al.* (2006) montrent cependant l'accumulation des HAP au niveau de corps lipidiques stockées dans les cellules racinaires et dans les hyphes fongiques. Cependant ces résultats ne sont pas transposable ici puisque l'expérience se base sur des cultures hors sol de racines, directement en contact avec les HAP (140 mg.L<sup>-1</sup>)

D'autres études montrent cependant un effet de la luzerne sur la dégradation des HAP, la classant d'ailleurs comme une des plantes les plus efficaces (Pradhan *et al.*, 1998). L'existence d'un gradient spatial de dissipation des HAP dans la rhizosphère du trèfle blanc sur un sol contaminé avec 2 g.Kg<sup>-1</sup> de HAP a été observée par Joner et Leyval (2003b). Ainsi, en fonction de la distance aux racines, et sur une distance de l'ordre du millimètre, la concentration était plus importante dans le sol planté ou dans le sol non planté. Corgié *et al.* (2003) ont observé, que la biodégradation du phénanthrène était fonction de la proximité aux racines du ray grass, mais ont aussi montré un gradient temporel dans la dégradation (Corgié *et al.*, 2004, Corgié, 2004).

La quantité de sol rhizosphérique est directement corrélée à la biomasse des plantes (résultats non présentés) qui est variable selon le traitement du sol et selon les modalités mises en place, ce qui a sans doute influencé la quantité et la qualité de l'exsudation racinaire. Cependant les effets rhizosphériques que l'on distingue dans cette étude ne sont pas directement corrélés aux biomasses des plantes. Les mécanismes impliqués dans la biodégradation des HAP dans la rhizosphère sont sans doute complexes, en liaison avec les

## PARTIE III - Chapitre II

### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt

sources de carbone et d'énergie, la disponibilité des nutriments, et aussi la biodisponibilité des HAP (adsorption sur les constituants du sol et dans la rhizosphère) (Joner et Leyval, 2003a). Selon Joner et Leyval (2003a) la zone de sol directement en contact avec les racines serait le lieu d'adsorption des HAP au niveau des débris cellulaires et des racines sénescents. La zone suivante serait la zone où les HAP seraient disponibles et enfin la zone suivante serait le lieu de dégradation des composés organiques. Cette dégradation serait en effet rendue possible par une quantité suffisante d'O<sub>2</sub>, de N, de P et d'exsudats riches en C. Ces résultats sont confirmés par Joner et Leyval (2003b). Corgié *et al.*, (2004) ont estimé que la fraction de sable où se situe le maximum de dégradation serait comprise entre 0 et 3mm.

De façon générale, la mycorhization a été montrée comme paramètre améliorant la dissipation des HAP et permettrait de réduire la toxicité des HAP ou de leurs métabolites. Joner *et al.* (2001) et Joner et Leyval (2003b) ont montré une diminution de la quantité de HAP dans le sol rhizosphérique du ray grass et du trèfle en présence de *Glomus mosseae* pour un sol artificiellement contaminé en HAP (1050 mg.Kg<sup>-1</sup>) et pour deux sols d'anciens sites industriels contaminés en HAP (405 mg.Kg<sup>-1</sup> et 2030 mg.Kg<sup>-1</sup>). Verdin *et al.* (2006) ont montré que la dégradation de l'anthracène (140 mg.L<sup>-1</sup>) augmente en présence de racines transformées et en conditions axéniques et que cette dégradation est améliorée par la mycorhization. Dans cette expérience, l'inoculation de la luzerne par *Glomus intraradices* n'a pas eu d'effet significatif sur la concentration en HAP dans le sol non traité et dans le sol traité par désorption thermique et l'a plutôt augmentée dans le sol traité par biopile. Dans le sol non traité pour la modalité inoculée et fertilisée la teneur en HAP est plus faible dans le sol rhizosphérique que dans le sol non rhizosphérique, mais n'est cependant pas inférieure à celle des autres modalités. Cette absence d'effet de l'inoculation peut être liée à la présence de champignons mycorhiziens dans les modalités non inoculées (sol non traité, traité par biopile), la faible teneur résiduelle en HAP (sol traité par désorption thermique), mais aussi à l'hétérogénéité entre les répétitions, ou encore à une faible biodisponibilité des HAP dans ces sols.

La nature et l'âge de la contamination pourraient intervenir dans la dégradation des HAP dans cette étude. Joner *et al.* (2004) montrent que le « priming effect », évoqué par Kuzyakov *et al.* (2000), serait responsable de la dégradation rapide (réduction de 24-38% en 5 semaines) des HAP contenus dans un sol contaminé depuis 50 ans (519 mg.Kg<sup>-1</sup>). En revanche, la biodégradation peut être limitée dans un sol anciennement contaminé en HAP

(Hatzinger et Alexander, 1995) ce qui est le cas ici. La dissipation des HAP dans la rhizosphère du ray grass immédiatement après la contamination du sol et après six mois de vieillissement de la contamination a été analysée par Binet *et al.* (2000a). Ces auteurs ont ainsi montré que la dissipation était plus faible après vieillissement de la pollution.

La répartition des différents HAP est variable selon le traitement du sol, mais varie peu selon les modalités. Huesemann *et al.*, (2004) suggèrent que les HAP de 3 cycles tel que le phénanthrène stimuleraient le cométabolisme pour permettre la dégradation des HAP de hauts poids moléculaires (e.g. pyrène, benzo[a]pyrène...). Dans ce travail, les résultats ne mettent pas en évidence de tels phénomènes de cométabolisme.

### 3.3.2. Les ETM

L'analyse des éléments en traces métalliques a été réalisée sur le plomb, le chrome, le nickel, le cadmium et le zinc. Toutefois, seules les analyses pour le zinc présentent des différences significatives entre certains traitements. L'inoculation des plantes par *Glomus intraradices* dans le sol traité par désorption thermique a permis de limiter le prélèvement de Zn par les plantes de façon significative. Il a été largement montré que les champignons mycorhiziens peuvent diminuer le transfert des ETM aux plantes et leur translocation, toutefois ceci dépend du pH du sol (El Kherbawy *et al.*, 1989), de l'ETM mis en jeu (Schüepp *et al.*, 1987), de l'espèce végétale et de l'espèce fongique en symbiose (Medeiros *et al.*, 1994). L'absorption des métaux par les plantes en présence de colonisation mycorhizienne était soit plus importante (Weissenhorn et Leyval, 1995), soit plus faible (Shüepp *et al.*, 1987 ; Leyval *et al.*, 1991 ; Weissenhorn *et al.*, 1995). Joner et Leyval (1997) ont observé que le prélèvement du Cd par *Trifolium subterraneum* L. en présence du champignon MA *Glomus mosseae* pouvait se faire dans les racines en cas de fortes concentrations de l'ETM, mais que la translocation vers les parties aériennes était réduite. Ricken et Höfner (1996) ont montré, comme dans notre étude avec le sol traité par désorption thermique, que la mycorhization de la luzerne par deux souches de *Glomus* a permis de réduire la concentration de métaux dans les parties aériennes et les racines par rapport aux plantes non mycorhizées, probablement dû, dans ce cas, à une séquestration des ETM dans les hyphes des champignons.

Cet effet n'est pas observé dans le sol non traité, ce qui n'est pas en opposition avec un effet bénéfique des champignons mycorhiziens pour limiter le transfert d'éléments en traces métalliques aux plantes puisque toutes les modalités du sol non traité présentaient une mycorhization des plantes (présence de champignon indigène). Dans le sol traité par biopile, l'inoculation mycorhizienne n'a pas eu non plus d'effet sur la teneur en zinc des plantes. Il faut souligner que dans le sol traité par désorption thermique le champignon n'a pas

## PARTIE III - Chapitre II

### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site d'Homécourt

significativement affecté la croissance des plantes, ce qui n'a pas été le cas pour ces deux autres sols, et qu'un effet dilution pourrait contribuer à expliquer cette réduction de concentration de zinc dans les plantes mycorhizées.

## CONCLUSION

Les principaux résultats de cette expérience indiquent que :

(i) la survie et la croissance de la luzerne sont plus faibles sur les sols traités par biopile et par désorption thermique du site d'Homécourt par rapport au sol non traité.

(i) le champignon mycorhizien contribue à la survie et à la croissance de la luzerne sur les sols traités, notamment en améliorant la nutrition en phosphore (sol traité par désorption thermique) et la nodulation. La symbiose mycorhizienne agit sur les communautés microbiennes des sols en (a) réduisant la diversité fongique du sol non traité et du sol traité par biopile tandis qu'il augmente la diversité fongique dans le sol traité par désorption thermique et (b) modifie les communautés bactériennes. La mycorhization n'a pas eu d'effet sur la dégradation des HAP dans cette expérience, mais elle a réduit la teneur en Zn dans la luzerne sur le sol traité par désorption thermique.

(ii) la fertilisation qui améliore la croissance de la luzerne dans le sol traité par désorption thermique va également modifier les communautés fongiques dans le sol traité par biopile. L'apport de nutriments n'affecte pas la dégradation des HAP

(iii) dans cette expérience, où il n'y avait pas de traitements non plantés, la concentration en HAP dans le sol adhérent a été comparée à celle du sol non adhérent, considéré comme non rhizosphérique. Si les teneurs en HAP ont diminué globalement par rapport aux sols initiaux dans toutes les modalités, c'est dans le sol non rhizosphérique que la concentration en HAP était la plus faible en fin d'expérience.

# PARTIE III

## CHAPITRE III

---

Dynamique des polluants et des communautés microbiennes  
dans la rhizosphère de luzerne mycorhizée ou non:  
cas des sols contaminés et traités du site de Neuves-Maisons



site de Neuves-Maisons



traitement par désorption thermique



## INTRODUCTION

Le chapitre précédent a mis en évidence l'intérêt de la mycorhization pour la culture de la luzerne sur un sol contaminé, celui du site d'Homécourt, et a montré surtout la dépendance de la plante vis à vis de la mycorhization lorsque le sol a été traité par biopile et par désorption thermique. Afin de valider ces résultats sur un autre sol, dans ce chapitre, le sol du site de Neuves-Maisons a été utilisé, qui présente une contamination en HAP plus faible, mais une teneur en ETM plus élevée, et qui a aussi fait l'objet d'un traitement par désorption thermique. Le présent chapitre se base, comme pour le sol d'Homécourt sur une culture de luzerne en vase de végétation en présence de *Glomus intraradices* et de fertilisation. L'impact des polluants et du traitement par désorption thermique sur la culture de la luzerne et la symbiose mycorhizienne ainsi que l'impact de cette culture sur la dynamique des polluants (HAP et ETM) et des communautés microbiennes ont été évalués.

### 1. CONDUITE DE L'EXPERIENCE

Les deux sols issus du site industriel de Neuves-Maisons ont été utilisés au cours de cette expérience: le sol non traité et le sol traité par désorption thermique. Ces sols ont été utilisés sans stérilisation préalable dans une expérience en vase de végétation (700 g de sol sec) avec de la luzerne. La culture a été menée selon six modalités, dont quatre identiques à celles de l'expérience précédente, plantées avec ou sans apport de fertilisation et d'inoculum mycorhizien (I/F, I/NF, NI/F, NI/NF) et deux modalités non plantées (Chapitre II partie III) avec ou sans apport de fertilisation :

- (i) non plantée et fertilisée (NP/F)
- (ii) non plantée et non fertilisée (NP/NF)

Contrairement à l'expérience précédente, le sol rhizosphérique occupait la totalité des pots de certaines modalités nécessitant l'utilisation des modalités non plantées comme témoins sans plantes.

Les six traitements ont été réalisés pour chacun des deux sols, avec quatre répétitions par traitement et trois plantes par pot. Cette culture a été menée durant 37 jours, sous conditions contrôlées (partie II matériels et méthodes). Le temps de culture, différent de celui de l'expérience précédente, a été déterminé par la survie des plantes : l'expérience a du être arrêtée suite à la mortalité des plantes des modalités non inoculées pour le sol non traité (figures 36 et 37).

### PARTIE III - Chapitre III

#### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site de Neuves Maisons

Les paramètres mesurés ont été la survie des plantes, la biomasse sèche, la teneur en éléments majeurs et en traces dans les parties aériennes, la colonisation mycorhizienne par coloration de racines, la présence de nodules sur les racines, le pH du sol, le dénombrement de la microflore totale et de la microflore dégradant les HAP et la teneur en HAP dans le sol rhizosphérique et dans le sol non planté prélevés en fin d'expérience (partie II matériels et méthodes). Dans cette expérience, certains pots étaient totalement colonisés par le système racinaire à l'issue de la culture. Il était alors impossible d'isoler du sol non rhizosphérique. Ainsi, les modalités non plantées ont servi de témoin aux modalités plantées. Durant cette expérience, la croissance de la luzerne a été peu importante. Cependant, les biomasses des parties racinaires de certains pots étaient faibles. En raison de la forte hétérogénéité des données, liée aux quantités de matière sèche très limitées, les analyses portant sur les racines n'ont pas pu être exploitées et ne sont pas présentées. Au vu de la faible croissance des plantes, et de la faible colonisation mycorhizienne dans le sol traité, les analyses moléculaires des communautés microbiennes, plus coûteuses et assez longues, n'ont pas été effectuées dans cette expérience, et seules les bactéries cultivables totales et dégradantes ont été dénombrées.

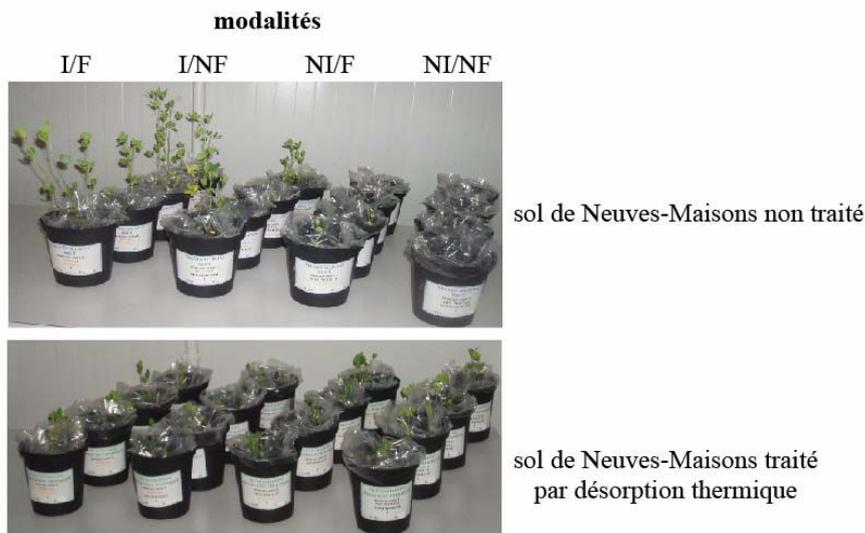


Figure 36 : Photographies du dispositif après 37 jours de culture

## 2. RESULTATS

### 2.1. CROISSANCE DES PLANTES

#### 2.1.1. Survie des plantes

L'analyse statistique réalisée sur l'ensemble des données montre que la survie de la luzerne (résultats non présentés) n'est pas influencée par le traitement du sol. Sur chacun des sols, l'inoculation et la fertilisation n'ont pas eu d'effet significatif sur la survie des plantes.

### PARTIE III - Chapitre III

#### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site de Neuves Maisons

Pour le sol non traité, même si les différences ne sont pas significatives, la survie des plantes est variable selon les modalités. En effet, elle est de 100% pour les modalités inoculées, de 75% pour la modalité non inoculée et non fertilisée et de 92% pour la modalité non inoculée et fertilisée. En revanche, le sol traité par désorption thermique conduit à un taux de survie de la luzerne de 100% pour l'ensemble des modalités.

#### **2.1.2. Biomasse des plantes**

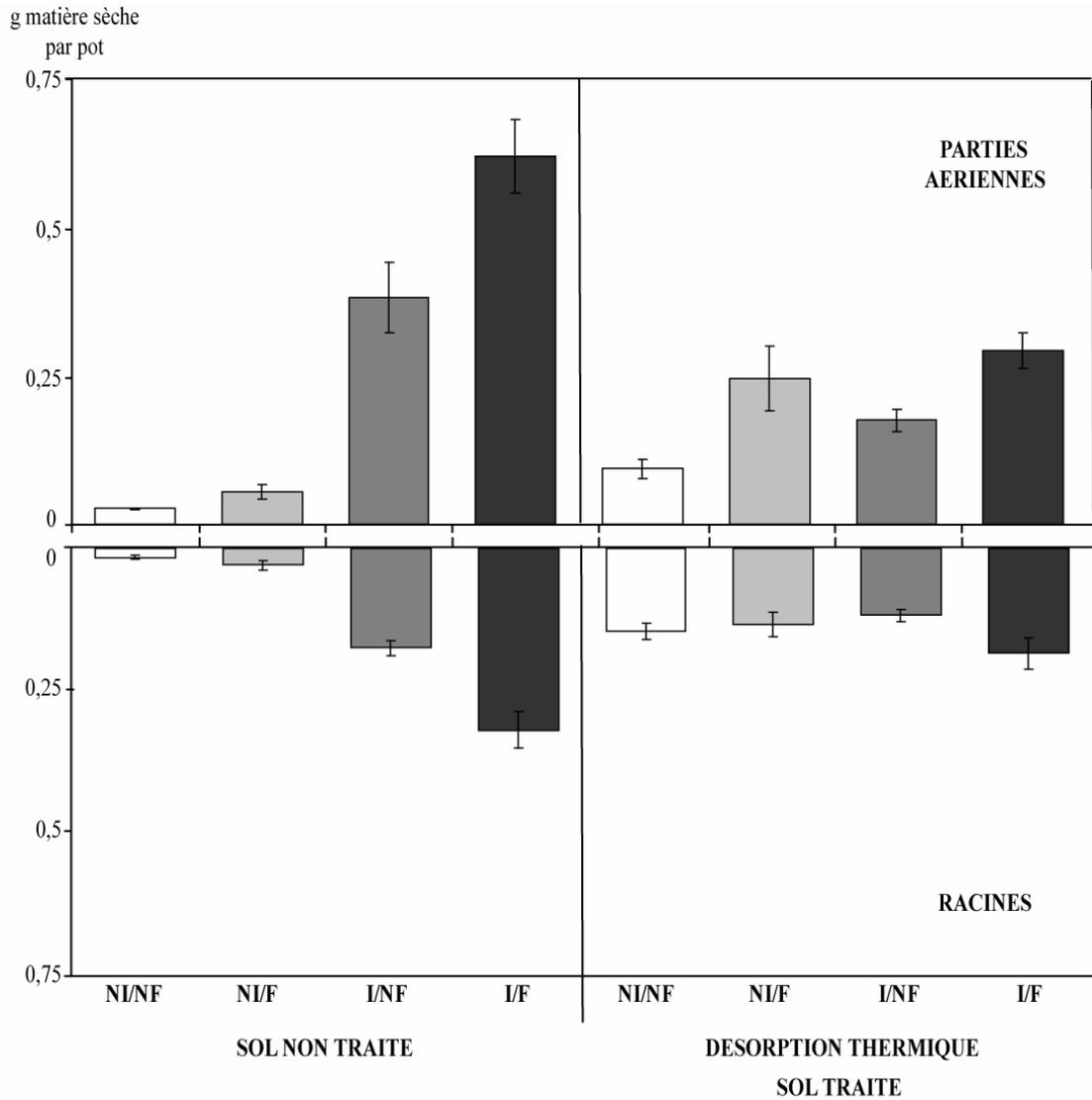
Il faut souligner que la biomasse des plantes sur les sols de Neuves-Maisons a été beaucoup plus faible que sur ceux d'Homécourt, et que l'expérience a dû être arrêtée au bout de 37 jours pour cette raison. La biomasse des parties aériennes et des racines (figure 37) est significativement plus faible ( $p \leq 0,05$ ) pour le sol non traité que pour le sol traité par désorption thermique.

Pour le sol non traité, l'inoculation mycorhizienne a un effet significatif ( $p \leq 0,001$ ) sur la croissance des plantes. La présence du champignon mycorhizien augmente de près de 12 fois la biomasse foliaire et près de 10 fois la biomasse racinaire de la luzerne par rapport au traitement non inoculé et non fertilisé. Pour ce sol, la fertilisation a également un effet significatif sur la biomasse foliaire ( $p \leq 0,05$ ) et racinaire ( $p \leq 0,01$ ). La prise de biomasse engendrée par cette fertilisation est plus importante pour les parties aériennes (1,8 fois) que pour les racines (1,6 fois) par rapport au témoin non fertilisé et non inoculé.

Pour le sol traité par désorption thermique, l'inoculation n'influence pas la croissance des plantes. La fertilisation, quant à elle, augmente la biomasse des parties aériennes ( $p \leq 0,05$ ) et des parties racinaires ( $p \leq 0,001$ ). L'effet bénéfique de la fertilisation se traduit par une biomasse foliaire 2 fois plus importante et une biomasse racinaire 1,2 fois plus importante que celles des plantes non fertilisées et non inoculées.

### PARTIE III - Chapitre III

#### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site de Neuves Maisons



<b>ANOVA</b>	<b>S *</b>		
<i>Parties aériennes</i>	<i>I</i>	***	<i>n.s.</i>
	<i>F</i>	**	**
	<i>IxF</i>	*	<i>n.s.</i>
<i>Racines</i>	<i>I</i>	***	<i>n.s.</i>
	<i>F</i>	*	***
	<i>IxF</i>	*	<i>n.s.</i>

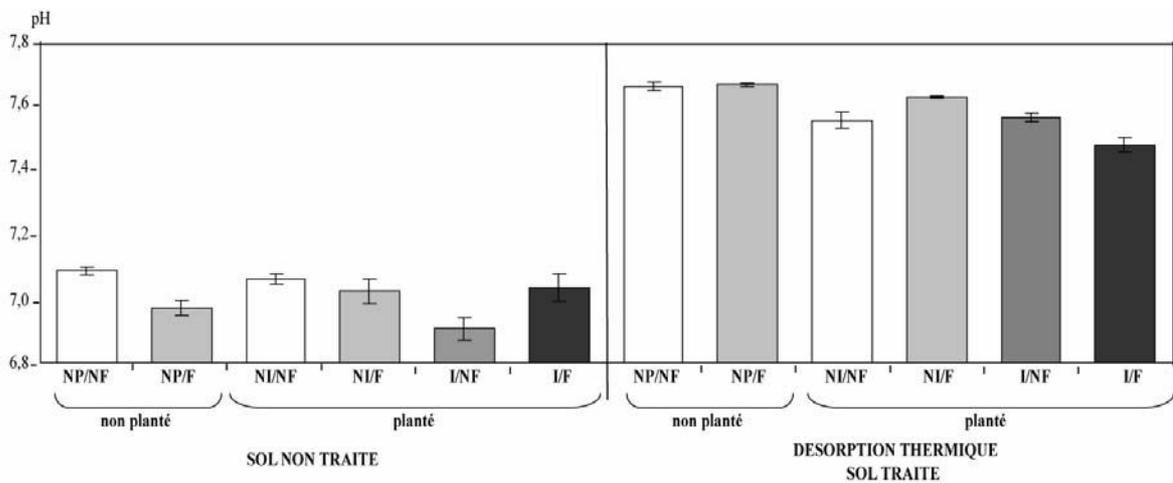
**Figure 37 : Biomasse dans les parties aériennes et les racines de luzerne après 37 jours de culture sur le sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique**

Les barres présentent les erreurs standard (n=4). Les analyses statistiques sont réalisées sur le paramètre sol (S) par ANOVA à trois niveaux, et pour chaque sol sur les paramètres inoculation (I) et fertilisation (F) par ANOVA à deux niveaux. Les différences significatives sont données, pour le paramètre S, par deux lettres distinctes et sont précisées, pour l'ensemble des paramètres, avec \* :  $p \leq 0,05$ , \*\* :  $p \leq 0,01$ , \*\*\* :  $p \leq 0,001$  et *n.s.* : effet non significatif.

### 2.1.3. Mesure du pH dans le sol après culture

L'analyse statistique réalisée sur l'ensemble des valeurs de pH montre que le sol traité par désorption thermique a un pH légèrement, mais significativement ( $p \leq 0,001$ ), plus basique (7,6) que celui du sol non traité (7,0) (figure 38).

Pour le sol non traité, ni la présence de plantes, ni les modalités de culture (inoculation et fertilisation), ne modifient significativement le pH du sol. En revanche, pour le sol traité par désorption thermique, la présence de plantes se traduit par des valeurs de pH du sol significativement ( $p \leq 0,001$ ) plus faibles. Pour ce sol, l'inoculation a un effet significatif ( $p \leq 0,01$ ) sur le pH qui diminue en présence de champignon mycorhizien.



ANOVA S***		
Effet plantes	n.s	***
I	n.s.	**
F	n.s.	n.s.
IxF	n.s.	n.s.

**Figure 38 : Mesures du pH du sol planté et non planté après 37 jours de culture de la luzerne sur le sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique.**

Les barres présentent les erreurs standard (n=4). Les analyses statistiques sont réalisées sur le paramètre sol (S) par ANOVA à trois niveaux, et pour chaque sol sur les paramètres inoculation (I) et fertilisation (F) par ANOVA à deux niveaux. Les différences significatives sont données, pour le paramètre S, par deux lettres distinctes et sont précisées, pour l'ensemble des paramètres, avec \*\* :  $p \leq 0,01$ , \*\*\* :  $p \leq 0,001$  et n.s : effet non significatif.

## 2.2. NUTRITION MINERALE

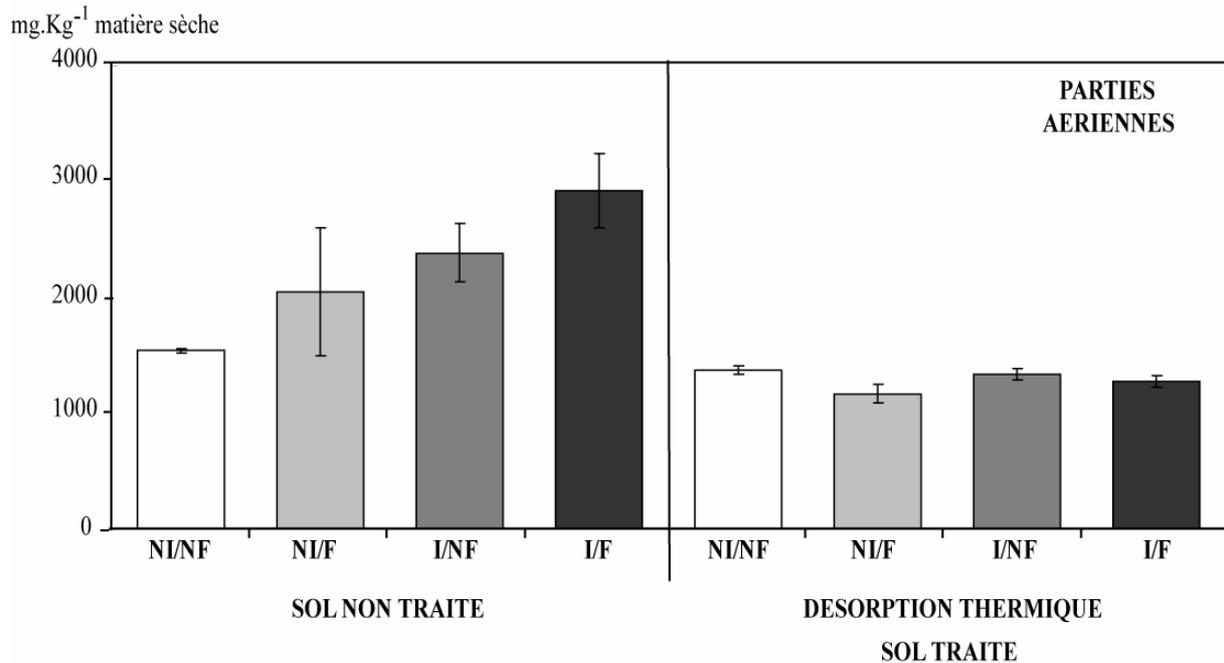
### 2.2.1. Teneur en phosphore

Les teneurs en phosphore dans les parties aériennes de la luzerne diffèrent significativement ( $p \leq 0,001$ ) pour le sol non traité et le sol traité par désorption thermique (figure 39). La quantité de phosphore est plus importante pour le sol non traité (1,8 fois plus que pour le sol traité par désorption thermique). Pour ce sol, l'inoculation et la fertilisation

### PARTIE III - Chapitre III

#### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site de Neuves Maisons

semblent augmenter l'absorption du phosphore, mais les différences ne sont pas significatives. Pour le sol traité par désorption thermique, les concentrations de phosphore dans les plantes varient moins avec les modalités, et restent plus faibles que dans le sol non traité.



ANOVA S \*\*\*

I	n.s.	n.s.
F	n.s.	*
IxF	n.s.	n.s.

**Figure 39 : Teneur en phosphore dans les parties aériennes et les racines de luzerne après 37 jours sur le sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique.**

Les barres présentent les erreurs standard (n=4). Les analyses statistiques sont réalisées sur le paramètre sol (S) par ANOVA à trois niveaux, et pour chaque sol sur les paramètres inoculation (I) et fertilisation (F) par ANOVA à deux niveaux. Les différences significatives sont données, pour le paramètre S, par deux lettres distinctes et sont précisées, pour l'ensemble des paramètres, avec \* :  $p \leq 0,05$ , \*\*\* :  $p \leq 0,001$  et n.s. : effet non significatif.

#### 2.2.2. Teneurs en éléments majeurs

Les luzernes présentent des teneurs en **potassium** significativement plus importantes ( $p \leq 0,001$ ) pour le sol traité par désorption thermique que dans le sol non traité (figure 40). Pour le sol non traité, les plantes inoculées et fertilisées montrent des concentrations plus élevées de K, mais seul l'effet combiné de l'inoculation et de la fertilisation est significatif ( $p \leq 0,05$ ). Pour le sol traité par désorption thermique, les différences entre les modalités ne sont pas significatives.

### PARTIE III - Chapitre III

#### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site de Neuves Maisons

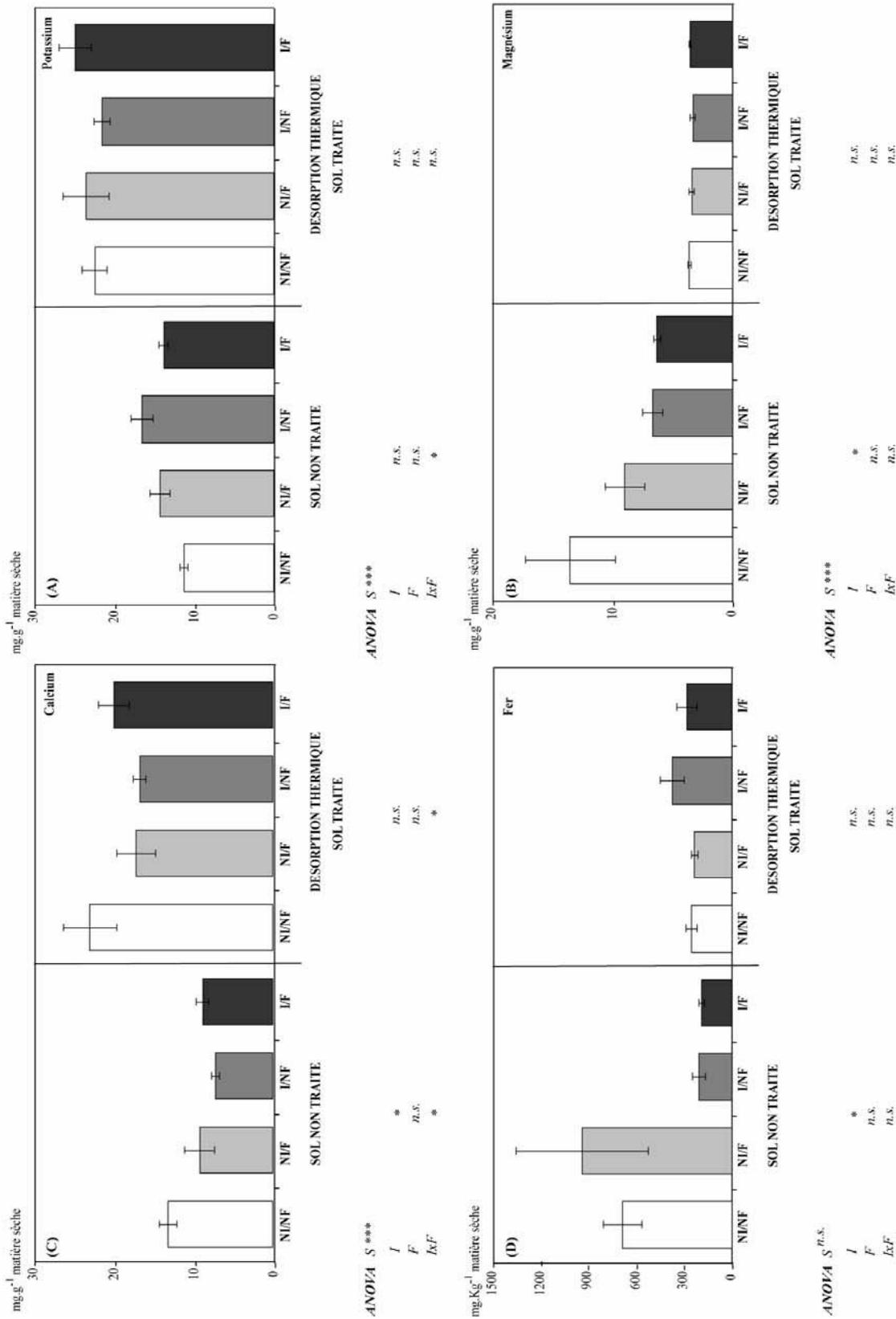
Les teneurs en **calcium** dans les parties aériennes de la luzerne (figure 40) sont aussi significativement plus faibles ( $p \leq 0,001$ ) dans le sol non traité que dans le sol traité par désorption thermique. Pour le sol non traité, l'inoculation et la combinaison de l'inoculation et de la fertilisation conduisent à une réduction significative de la teneur en Ca ( $p \leq 0,05$ ). La même tendance est observée dans le sol traité par désorption thermique, mais seul l'effet combiné de l'inoculation et de la fertilisation diminue significativement ( $p \leq 0,05$ ) les teneurs en calcium des parties aériennes.

Les teneurs en **magnésium** dans les parties aériennes des luzernes sont significativement ( $p \leq 0,001$ ) plus importantes dans le sol non traité que dans le sol traité par désorption thermique (figure 40). Les plantes inoculées par le champignon mycorhizien ont des teneurs significativement ( $p \leq 0,05$ ) plus faibles en Mg que les non mycorhizées dans le sol non traité. Aucune modalité n'a eu d'effet significatif dans le sol traité par désorption thermique.

Les teneurs en **fer** dans les parties aériennes de la luzerne (figure 40) ne sont pas significativement différentes d'un sol à l'autre. L'inoculation conduit à une réduction significative des teneurs en fer dans les parties aériennes de la luzerne pour le sol non traité ( $p \leq 0,05$ ) tandis que la fertilisation n'a pas d'incidence sur l'absorption du fer pour ce sol. L'inoculation et la fertilisation n'ont pas d'effet significatif sur les teneurs en fer dans les plantes.

PARTIE III - Chapitre III

Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site de Neuves Maisons



**Figure 40 : Teneurs en potassium, magnésium, calcium et fer dans les parties aériennes de luzerne après 37 jours sur le sol de Neuves-maisons non traité et traité par désorption thermique.**

Les barres présentent les erreurs standard (n=4). Les analyses statistiques sont réalisées sur le paramètre sol (S) par ANOVA à trois niveaux, et pour chaque sol sur les paramètres inoculation (I) et fertilisation (F) par ANOVA à deux niveaux. Les différences significatives sont données, pour le paramètre S, par deux lettres distinctes et sont précisées, pour l'ensemble des paramètres, avec \* : p≤0,05, \*\*\*\* : p≤0,001 et n.s. : effet non significatif.

## 2.3. PARAMETRES MICROBIOLOGIQUES

### 2.3.1. Estimation de la colonisation mycorhizienne

La **fréquence de la mycorhization** des racines (tableau 32) est significativement influencée par le traitement du sol ( $p \leq 0,001$ ). La différence entre les deux sols est très importante puisque le sol traité par désorption thermique a une fréquence de mycorhization quasiment nulle. Toutefois, dans les deux sols non inoculés et non fertilisés, il n'y a pas de colonisation mycorhizienne. Pour le sol non traité, l'inoculation augmente significativement ( $p \leq 0,001$ ) la fréquence de la mycorhization qui atteint des valeurs très élevées (70% à 100%). La fertilisation améliore également significativement la fréquence de mycorhization, mais celle-ci reste faible ( $p \leq 0,001$ ). Pour le sol traité par désorption thermique, l'inoculation et la fertilisation n'ont pas d'effet sur la fréquence de la mycorhization. Seule la modalité inoculée et fertilisée montre la présence du champignon mycorhizien avec une faible valeur de fréquence de mycorhization (2,5%).

L'**intensité de la colonisation mycorhizienne** dépend également du traitement du sol ( $p \leq 0,001$ ). L'absence de champignon mycorhizien pour le sol traité par désorption thermique est là encore très nette (tableau 32). Seule l'inoculation a un effet bénéfique sur l'intensité de la colonisation ( $p \leq 0,001$ ) qui atteint 20% dans le cas du sol non traité. Pour le sol traité par désorption thermique, l'inoculation et la fertilisation n'ont pas d'effet sur l'intensité de la colonisation mycorhizienne, présente uniquement dans la modalité inoculée et fertilisée (0,1%).

L'influence significative du traitement du sol est également observée pour la **teneur en arbuscules** estimée sur la partie mycorhizée ou sur l'ensemble du système racinaire (tableau 32) ( $p \leq 0,001$ ). Le sol traité par désorption thermique présente également des valeurs très basses à nulles pour ces paramètres. L'inoculation augmente significativement la teneur en arbuscules de la partie mycorhizée et du système racinaire uniquement pour le sol non traité, tandis que la fertilisation l'augmente dans le même sol mais de manière non significative.

Le **nombre de nodosités** présentes sur les racines de la luzerne après culture est significativement différent d'un sol à l'autre ( $p \leq 0,001$ ) (tableau 32). Quoiqu'il en soit les nodosités sont peu présentes dans cette expérience ; leur nombre est faible dans le sol non traité et quasiment nul dans le sol traité par désorption thermique.

### PARTIE III - Chapitre III

Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site de Neuves Maisons

**Tableau 32 : Paramètres de mycorhization et nombre de nodosités dans les racines de la luzerne après 37 jours sur le sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique**

Les barres présentent les erreurs standard (n=4). Les analyses statistiques sont réalisées sur le paramètre sol (S) par ANOVA à trois niveaux, et pour chaque sol sur les paramètres inoculation (I) et fertilisation (F) par ANOVA à deux niveaux. Les différences significatives sont données, pour le paramètre S, par deux lettres distinctes et sont précisées, pour l'ensemble des paramètres, avec \*\* :  $p \leq 0,01$ , \*\*\* :  $p \leq 0,001$  et n.s : effet non significatif.

		Mycorhization		Teneur en arbuscules		Nombre de nodosités par pot
		Fréquence (F) en %	Intensité (M) en %	partie mycorhizée (a) en %	système racinaire (A) en %	
Sol non traité	NI/NF	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0 0 ± 0,0	0 0 ± 0,0	0,8 ± 0,5
	NI/F	6,7 ± 2,4	0,2 ± 0,1	17,5 ± 11,1	0,1 ± 0,1	2,0 ± 0,7
	I/NF	70,0 ± 6,2	14,7 ± 4,6	72,3 ± 3,4	10,2 ± 3,0	4,5 ± 1,7
	I/F	100,0 ± 0,0	21,9 ± 2,9	44,3 ± 1,1	9,7 ± 1,4	2,3 ± 1,3
	ANOVA I	***	***	***	***	n.s
	F	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	IxF	**	n.s.	**	n.s.	n.s.
Sol traité désorption thermique	NI/NF	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	NI/F	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	I/NF	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	I/F	2,5 ± 1,6	0,1 ± 0,1	25,0 ± 14,4	0,1 ± 0,0	0,5 ± 5,0
	ANOVA I	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s
	F	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	IxF	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
ANOVA	S ***	S ***	S ***	S ***	S ***	

#### 2.3.2. Analyses microbiologiques des sols après culture de la luzerne

Le dénombrement de la **microflore bactérienne totale cultivable** montre des différences significatives entre les deux sols issus du site industriel de Neuves-Maisons ( $p \leq 0,05$ ) (tableau 33), avec un nombre plus important dans le sol traité par désorption thermique par rapport au sol non traité.

La culture de luzerne n'a pas modifié significativement la quantité de bactéries présentes dans le sol non traité. En revanche, l'inoculation du champignon mycorhizien a permis d'augmenter significativement ( $p \leq 0,01$ ) la microflore totale du sol non traité tandis que la fertilisation n'a montré aucun effet. Pour le sol traité par désorption thermique, la présence de plantes n'a pas influencé le nombre de bactéries totales présentes dans le sol. Seule l'inoculation a modifié significativement le nombre de bactéries totales ( $p \leq 0,001$ ) en le diminuant.

Le dénombrement de la **microflore dégradant les HAP** ne montre pas de différences significatives entre les deux sols (tableau 33). Pour le sol non traité, la présence de plantes n'a pas modifié la quantité de bactéries dégradantes. Pour ce sol, l'inoculation a conduit à une réduction significative ( $p \leq 0,05$ ) du nombre de bactéries tandis que la fertilisation n'a pas eu

PARTIE III - Chapitre III

Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site de Neuves Maisons

d'effet. Pour le sol traité par désorption thermique et dans le cas de la modalité fertilisée, la présence de plantes a conduit à une augmentation de la quantité de bactéries dégradantes dans le sol. Pour les sols plantés, l'inoculation mycorhizienne et la fertilisation n'ont pas modifié le nombre de bactéries dégradantes.

**Tableau 33 : Dénombrement bactérien dans les sols plantés et non plantés après 37 jours sur le sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique**

Les barres présentent les erreurs standard (n= 3). Les analyses statistiques sont réalisées sur le paramètre sol (S) par ANOVA à trois niveaux, et pour chaque sol sur les paramètres inoculation (I) et fertilisation (F) par ANOVA à deux niveaux. Les sols non plantés ont été comparés statistiquement avec les modalités non inoculées pour mettre en évidence un « effet plantes ». Les différences significatives sont données, pour le paramètre S, par deux lettres distinctes et sont précisées, pour l'ensemble des paramètres, avec \* : p≤0,05, \*\* : p≤0,01, \*\*\* : p≤0.001 et n.s : effet non significatif.

		bactéries totales		bactéries dégradant les HAP	
		en bactérie.g <sup>-1</sup> sol sec		en bactérie.g <sup>-1</sup> sol sec	
Sol non traité	<i>Non planté</i>	NP/NF	9,54.10 <sup>4</sup> ± 4,19.10 <sup>4</sup>	2,75.10 <sup>5</sup> ± 4,77.10 <sup>4</sup>	
		NP/F	4,54.10 <sup>4</sup> ± 1,72.10 <sup>4</sup>	3,63.10 <sup>5</sup> ± 1,70.10 <sup>5</sup>	
	<i>Planté</i>	NI/NF	7,47.10 <sup>4</sup> ± 3,73.10 <sup>3</sup>	3,05.10 <sup>5</sup> ± 8,71.10 <sup>4</sup>	
		NI/F	5,55.10 <sup>4</sup> ± 2,17.10 <sup>4</sup>	2,82.10 <sup>5</sup> ± 1,23.10 <sup>4</sup>	
		I/NF	1,12.10 <sup>5</sup> ± 8,77.10 <sup>3</sup>	4,07.10 <sup>4</sup> ± 5,07.10 <sup>3</sup>	
		I/F	2,42.10 <sup>5</sup> ± 5,49.10 <sup>4</sup>	3,99.10 <sup>4</sup> ± 1,17.10 <sup>4</sup>	
	ANOVA	I	**	*	
		F	n.s.	n.s.	
		IxF	*	n.s.	
	<i>Effet plantes</i>		n.s.	n.s.	
Sol traité désorption thermique	<i>Non planté</i>	NP/NF	2,03.10 <sup>5</sup> ± 1,02.10 <sup>5</sup>	1,94.10 <sup>5</sup> ± 3,56.10 <sup>4</sup>	
		NP/F	3,07.10 <sup>5</sup> ± 1,66.10 <sup>5</sup>	8,35.10 <sup>4</sup> ± 4,26.10 <sup>4</sup>	
	<i>Planté</i>	NI/NF	4,17.10 <sup>5</sup> ± 8,29.10 <sup>4</sup>	6,66.10 <sup>5</sup> ± 2,84.10 <sup>4</sup>	
		NI/F	3,41.10 <sup>5</sup> ± 1,16.10 <sup>5</sup>	9,05.10 <sup>5</sup> ± 7,21.10 <sup>5</sup>	
		I/NF	1,60.10 <sup>5</sup> ± 4,32.10 <sup>4</sup>	1,94.10 <sup>5</sup> ± 7,22.10 <sup>4</sup>	
		I/F	2,03.10 <sup>5</sup> ± 2,94.10 <sup>4</sup>	2,41.10 <sup>5</sup> ± 1,04.10 <sup>5</sup>	
	ANOVA	I	***	n.s.	
		F	n.s.	n.s.	
		IxF	n.s.	n.s.	
	<i>Effet plantes (F)</i>		n.s.	***	

ANOVA

S \*

S n.s.

## 2.4. DEVENIR DES POLLUANTS

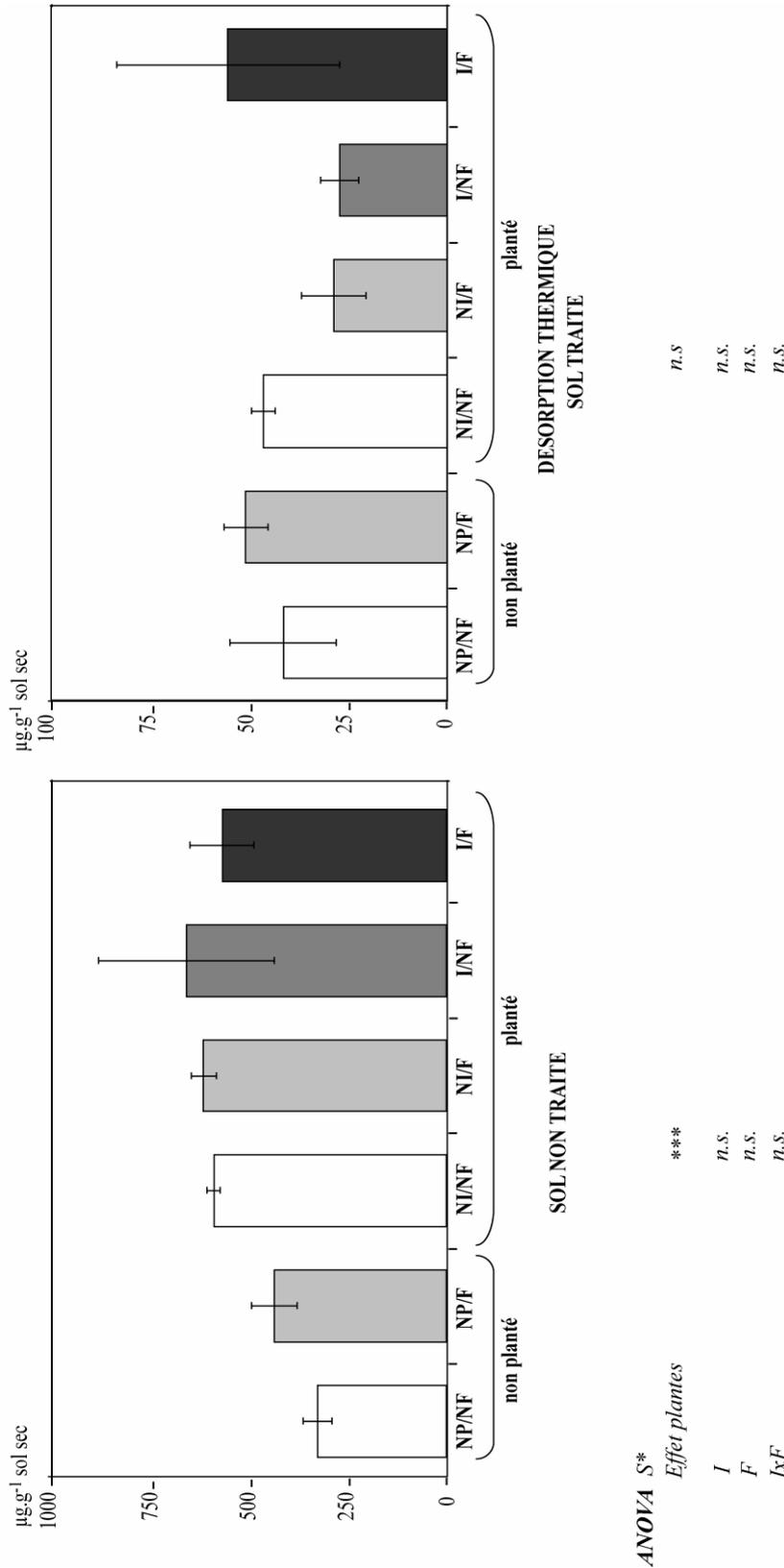
### 2.4.1. Teneurs en HAP dans le sol après culture

Dans le sol non traité, en présence de plantes, la **concentration de HAP** dans le sol est significativement ( $P \leq 0,05$ ) plus élevée que dans les pots non plantés (figure 41). Ni l'inoculation ni la fertilisation n'ont affecté la quantité d'hydrocarbures dans ce sol. Dans le sol traité par désorption thermique, ni la présence de plantes, ni l'inoculation ou la fertilisation n'ont modifié la teneur en HAP du sol.

Les deux sols se distinguent selon la **répartition des HAP**. En effet, les composés de hauts poids moléculaires (5 cycles) sont absents du sol traité par désorption thermique (figure 42).

Dans le sol non traité, qu'il soit planté ou non et quelles que soient les modalités, les HAP à 3 cycles benzéniques représentent environ 20% des HAP totaux, les HAP à 4 cycles 70% et les composés à 5 cycles benzéniques environ 10%. Ainsi, l'inoculation et la fertilisation ne montrent pas d'effet sur cette répartition des HAP.

Dans le sol traité par désorption thermique, on observe également une faible variabilité des pourcentages relatifs des différents HAP entre les sols non plantés et plantés, et entre les modalités. Les composés à 3 cycles représentent 23-30 % du total tandis que les composés à 4 cycles 70-77%.



**Figure 41: Teneur de l'ensemble des HAP dans le sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique, planté et non planté après 37 jours de culture**  
 Les barres présentent les erreurs standard (n=4). Les analyses statistiques sont réalisées sur le paramètre sol (S) par ANOVA à trois niveaux, et pour chaque sol sur les paramètres inoculation (I) et fertilisation (F) par ANOVA à deux niveaux. Les sols non plantés ont également fait l'objet de mesure des HAP. Ces derniers ont été comparés statistiquement avec les modalités non inoculées pour mettre en évidence un « effet plantes ». Les différences significatives sont données, pour le paramètre S, par deux lettres distinctes et sont précisées, pour l'ensemble des paramètres, avec \* : p≤0,05, \*\*\* : p≤0,001 et n.s : effet non significatif.

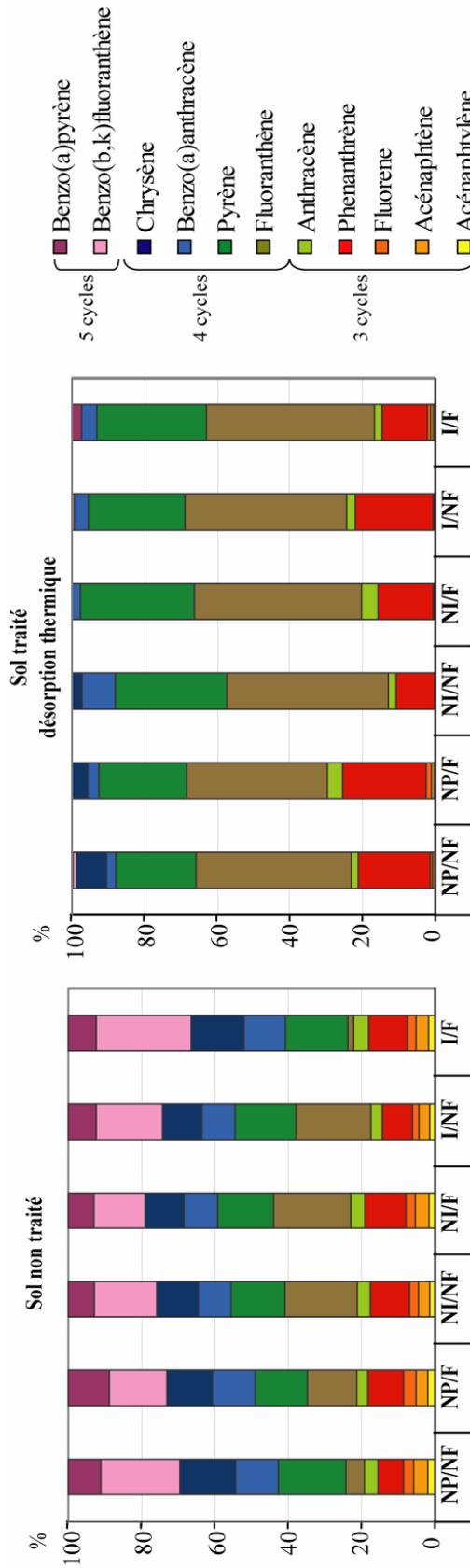


Figure 42: Répartition de l'ensemble des HAP dans le sol de Neuves-Maisons planté et non planté après 37 jours de culture.

#### 2.4.2. Teneurs en éléments en traces et en métalloïde

Les teneurs en **plomb** (Pb) dans les parties aériennes de la luzerne (figure 43) présentent des différences statistiquement significatives ( $p \leq 0,001$ ) entre les deux sols, le sol traité par désorption thermique ayant les teneurs en Pb dans les plantes plus faibles. Dans le sol non traité, l'inoculation réduit significativement ( $p \leq 0,001$ ) la teneur en Pb des parties aériennes de luzerne. Dans une moindre mesure, la fertilisation conduit également à des teneurs significativement plus faibles en Pb ( $p \leq 0,01$ ) dans les plantes. Pour le sol traité par désorption thermique, l'inoculation et la fertilisation n'ont pas influencé les teneurs en plomb.

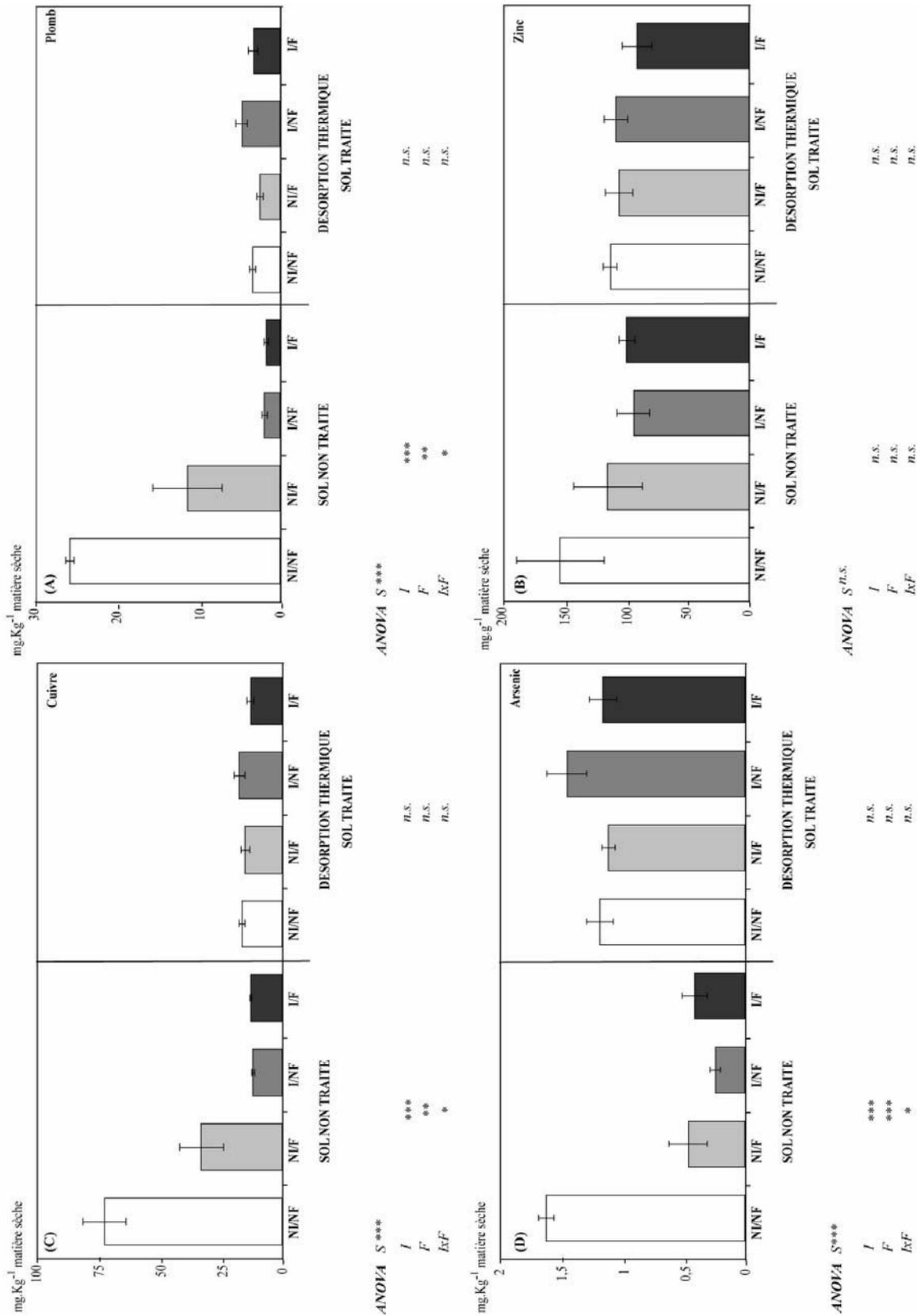
Pour le sol non traité, l'inoculation ( $p \leq 0,001$ ), la fertilisation ( $p \leq 0,01$ ) et l'association inoculation et fertilisation ( $p \leq 0,05$ ) conduisent à des teneurs en **cuivre** (Cu) et en **arsenic** (As) significativement plus faibles dans les parties aériennes de la luzerne (figure 43). Pour ces deux éléments, ni l'inoculation ni la fertilisation n'influencent les teneurs dans les plantes pour le sol traité par désorption thermique.

Pour le **zinc**, la même tendance est observée, mais les différences ne sont pas significatives (figure 43).

**NB :** Les teneurs en **arsenic** dans les parties racinaires de la luzerne (résultats non présentés) semblent être 10 fois plus importantes que celles trouvées dans les parties aériennes. Ces données sont à prendre avec réserve, compte tenu des faibles biomasses racinaires, mais ces analyses mériteraient d'être approfondies.

PARTIE III - Chapitre III

Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site de Neuves Maisons



**Figure 43: Teneurs en éléments en traces (plomb, zinc, cuivre) et métalloïde (arsenic) dans les parties aériennes de luzerne après 37 jours de culture sur le sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique.**

Les barres présentent les erreurs standard (n=4). Les analyses statistiques sont réalisées sur le paramètre sol (S) par ANOVA à trois niveaux, et pour chaque sol sur les paramètres inoculation (I) et fertilisation (F) par ANOVA à deux niveaux. Les différences significatives sont données, pour le paramètre S, par deux lettres distinctes et sont précisées, pour l'ensemble des paramètres, avec \* : p≤0,05, \*\* : p≤0,01, \*\*\* : p≤0,001 et n.s : effet non significatif.

### 3. DISCUSSION

#### 3.1. COLONISATION MYCORHIZIENNE DANS LES SOLS DE NEUVES-MAISONS

L'analyse des paramètres de mycorhization révèle que l'inoculation de *Glomus intraradices* n'a pas eu la même efficacité selon le sol. En effet, pour le sol traité par désorption thermique, l'inoculation du champignon MA n'a pas permis la mycorhization des plantes. En revanche, pour le sol non traité, la symbiose mycorhizienne est établie avec une fréquence élevée, et uniquement lorsqu'il y a eu inoculation préalable. Ceci indique l'absence de champignons MA indigènes dans ce sol. Pour le sol non traité, la fréquence de la mycorhization est améliorée par l'apport de fertilisation. Comme pour le sol d'Homécourt, la contamination en HAP du sol non traité n'a donc pas empêché la mycorhization de la luzerne par *Glomus intraradices*. Kirk *et al* (2005) ont montré dans une expérience sur des racines de carottes transformées que la germination de *Glomus intraradices* n'était pas affectée par la présence de gasoil mais réduisait seulement la colonisation et le développement des hyphes fongiques. Cependant, Leyval et Binet (1998) montrent une réduction de la mycorhization du trèfle et du ray grass lors d'un apport de plus 10 g.Kg<sup>-1</sup> d'anthracène. Les mêmes observations ont été faites par Joner et Leyval (2001b). De plus, Cabello (1997) montre lors d'une culture de luzerne, la réduction du nombre de propagules de *Glomus aggregatum* et *Glomus mosseae* pour un sol contaminé avec 700 mg.Kg<sup>-1</sup> de HAP. Toutefois, un nombre limité de spores ne montre pas nécessairement un faible développement du champignon MA (Whitfield *et al*, 2003).

L'absence de mycorhization pour le sol non traité et non inoculé et pour le sol traité par désorption thermique, peut être corrélée aux résultats de tests de germination des spores du champignon *Glomus mosseae* effectués au laboratoire (Norme AFNOR XP-X31-205-1, Leyval, communication personnelle). En effet, une étude a montré que le sol issu de l'ancien site industriel de Neuves-Maisons inhibe à 80% la germination des spores de *Glomus mosseae* pour le sol non traité et à 99% pour le sol traité par désorption thermique par rapport à du sable. Il semble que cette inhibition se manifeste également pour le champignon *Glomus intraradices* utilisé au cours de l'expérience. L'inhibition incomplète de la germination avec le sol non traité a permis une colonisation des racines, mais l'inhibition quasi totale de celle-ci dans le sol traité par désorption thermique n'a pas permis la colonisation de la plante.

La moins bonne mycorhization observée dans cette expérience comparativement aux résultats obtenus lors de l'expérience menée sur le sol de l'ancien site industriel d'Homécourt pourrait être attribuée à la différence de niveau de contamination en ETM de ce sol (chapitre

II partie III), notamment la teneur en Pb, Cr et en As. La densité de spores, la colonisation racinaire et la mycorhization peuvent être réduites par augmentation de la pollution métallique (Gildon et Tinker, 1983 ; Leyval et Joner, 2001). Pawlowska et Charvat (2004) ont montré que la germination des spores de *Glomus intraradices* était fortement voire totalement inhibée par des concentrations élevées de Cd, Pb et Zn. Weissenhorn et Leyval (1995) ainsi que Leyval *et al.*, (1994) ont montré également une réduction du nombre de spores de *Glomus mosseae* en cas de forte contamination du sol en Cd. Toutefois il apparaît que la teneur en ETM et leur disponibilité ainsi que le potentiel adaptatif du champignon MA à la présence de contaminant métallique jouent un rôle primordial dans la mycorhization. C'est ainsi que certains auteurs observent une augmentation de la colonisation avec l'augmentation de la teneur en ETM (Hildebrandt *et al.*, 1999).

La pollution métallique des deux sols issus de l'ancien site industriel de Neuves-Maisons est sensiblement la même pour le sol non traité et pour le sol traité par désorption thermique. L'absence de mycorhization dans ce dernier ne peut donc pas être expliquée uniquement par la forte concentration en éléments métalliques. Le traitement de dépollution a affecté les propriétés physico-chimiques de ce sol et ainsi modifié ses capacités hydriques. Un stress hydrique pourrait avoir contribué à la faible sporulation d'une part et la faible mycorhization d'autre part observées dans ce sol, même si certains auteurs observent une augmentation de la production de spores en cas de stress hydrique (Simpson et Daft, 1990).

### 3.2. MICROFLORE BACTERIENNE DANS LES SOLS DE NEUVES-MAISONS A L'ISSUE DE LA CULTURE DE LA LUZERNE

Dans cette expérience, seule la microflore cultivable a été estimée, ce qui ne représente qu'un faible pourcentage de la microflore bactérienne totale (paragraphe 2.3.1.). Toutefois, cette méthode permet de comparer les différents traitements et de donner des indications sur cette microflore. Les résultats montrent des quantités de bactéries assez peu importantes par rapport aux valeurs communément rencontrées dans les sols, mais, en revanche, par rapport à ce nombre, celui des bactéries dégradantes est équivalent, voire même plus élevé, ce qui indique qu'une grande proportion des bactéries de ces sols est capable de dégrader les HAP. Le nombre de bactéries dégradantes est même dans certains cas supérieur au nombre de bactéries totales, ce qui peut être expliqué par le fait que les dénombrements sont faits sur des milieux différents. La présence d'hydrocarbures et de métaux a pu être un frein à l'activité bactérienne de ces sols, exceptée la microflore adaptée. En effet, les HAP et les ETM réduisent la quantité de microorganismes dans les sols contaminés (Nichols *et al.*,

### PARTIE III - Chapitre III

#### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site de Neuves Maisons

1997). Sokhn *et al.* (2001) ont observé, quand à eux, que dans un sol contaminé en phénanthrène ( $400 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) et en cuivre ( $70 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) l'activité microbienne était réduite par rapport au témoin sans cuivre. Kozdrój et Van Elsas (2000) ont montré une réduction du nombre de bactéries cultivables lors de l'augmentation de la contamination du sol en plomb, cadmium et zinc.

La quantité de bactéries cultivables totales en fin de culture dans les sols plantés et non plantés est plus grande pour le sol traité par désorption thermique que pour le sol non traité. Ceci pourrait être lié à une recolonisation importante du sol après le traitement, suite à la stérilisation occasionnée par celui-ci. Cet effet n'est pas observé sur la microflore bactérienne dégradant les HAP, et suggère que cette recolonisation concernerait surtout une microflore non spécifique. Étonnamment, la quantité de bactéries dégradant les HAP n'est pas significativement différente d'un sol à l'autre. Ainsi ce n'est pas la concentration d'HAP qui détermine la quantité de bactéries dégradant ceux-ci, qui sont déterminées par la concentration en substrat.

Les résultats ne montrent pas d'effet rhizosphère sur le nombre de bactéries totales et dégradantes dans le sol non traité. En revanche, dans le sol traité par désorption thermique, la rhizosphère augmente le nombre de bactéries dégradantes. Kirk *et al.* (2005) ont montré une plus grande quantité de bactéries dans le sol rhizosphérique de la luzerne par rapport au reste du sol contaminé en hydrocarbures ( $31\,000 \text{ mg.Kg}^{-1}$  d'hydrocarbures totaux). Ces auteurs ont montré également que l'apport d'exsudats racinaires permettait d'augmenter la quantité de bactéries. Dans le cas présent, la faible biomasse des plantes dans le sol non traité pourrait expliquer l'absence d'effet rhizosphérique. L'inoculation par le champignon MA et l'inoculation combinée à la fertilisation, en augmentant la croissance de la plante, ont conduit à une augmentation de la microflore bactérienne totale dans le sol non traité, mais pas la microflore dégradante. En revanche, pour le sol traité par désorption thermique, la quantité de bactéries cultivables semblerait être diminuée par l'inoculation, mais la colonisation obtenue était très faible.

Ces paramètres microbiologiques montrent une activité biologique (mycorhization, microflore bactérienne) relativement homogène dans le sol traité par désorption thermique. En fait, ceci conduit à reconsidérer les modalités de ce sol, les réduisant à des modalités fertilisées ou non.

Les microorganismes qui peuvent d'une part dégrader les HAP, et d'autre part freiner l'absorption des ETM par les racines en modifiant la biodisponibilité (Lasat, 2002) et la

spéciation du métal (Gadd, 2004) ont été influencés par la mycorhization de la luzerne pour le sol non traité.

### 3.3. CROISSANCE DES PLANTES ET ABSORPTION MINERALE

Même si les différences ne sont pas significatives, le sol provenant de l'ancien site industriel de Neuves-Maisons traité par désorption thermique a présenté une meilleure survie de la luzerne que le sol non traité. L'expérience a en effet dû être arrêtée en raison de la très faible croissance des luzernes dans les deux cas, mais tout particulièrement dans le sol non traité.

Pour le sol non traité, la survie des plantes a été dépendante de l'inoculation par le champignon MA *Glomus intraradices*. En effet, en absence de symbiose mycorhizienne, la mortalité de la luzerne a été augmentée et a conduit à l'arrêt de l'expérience. Ceci confirme le rôle bénéfique de la symbiose mycorhizienne pour la protection des plantes envers les atteintes causées par la contamination du sol comme l'ont montré Leyval et Binet (1998) dans une culture de trèfle et de ray grass sur un sol artificiellement contaminé en HAP, et comme l'ont montré de nombreux auteurs pour la contamination par les ETM (Leyval *et al*, 2002). Cependant, il n'existe pas à notre connaissance de travaux effectués sur des sols présentant une pollution mixte métallique et organique. Ces résultats soulignent ainsi la forte dépendance mycorhizienne de la luzerne dans ces conditions. La fertilisation, quant à elle, a aussi amélioré la survie de la luzerne, mais son effet a été plus important lorsque les plantes étaient inoculées par le champignon MA. Il est cependant difficile dans ce cas-là de savoir si la plus forte biomasse observée pour la modalité inoculée et fertilisée dans le sol non traité est le résultat cumulé de l'inoculation et de la fertilisation ou si la symbiose mycorhizienne améliorée par la fertilisation est d'autant plus efficace.

Le traitement du sol par désorption thermique ne permet pas d'éliminer l'ensemble de la contamination mais uniquement les composés volatilisables lors du chauffage du sol, c'est-à-dire principalement les HAP. Ces résultats permettent de mettre en évidence que la forte diminution de la concentration des HAP a permis d'améliorer la survie et la croissance de la luzerne. La croissance des plantes dans le sol traité par désorption thermique est aussi améliorée par les nutriments apportés par la fertilisation.

Il faut souligner l'absence de nodosités pour le sol traité par désorption thermique, tandis que le sol non traité en présentait un peu plus. Même si les différences ne sont pas significatives, l'inoculation et la fertilisation semblent avoir augmenté le nombre de nodosités

### PARTIE III - Chapitre III

#### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site de Neuves Maisons

présentes dans les racines dans le sol non traité. Pour le sol traité par désorption thermique, la modalité inoculée fertilisée, qui est la seule à présenter des traces de mycorhization, est également la seule à présenter des traces de nodulation. Cette faible nodulation pourrait expliquer également en partie la faible biomasse des plantes. La nodulation par des bactéries (e.g. genre *Rhizobium*) s'adapte davantage aux contaminations organiques puisque ces bactéries peuvent s'adapter à différentes sources de carbone (Siciliano *et al.*, 1998) mais s'avère être sensible à une exposition aux ETM (Giller *et al.* ; 1998 ; McGrath *et al.*, 1995 ;). Ceci pourrait expliquer la faible nodulation observée au cours de cette expérience, compte tenu de la contamination en ETM importante de ces sols.

Pour le sol non traité, la culture de la luzerne n'affecte pas les valeurs de pH du sol. En revanche, les plantes ont tendance à l'acidifier. Cette baisse de valeur de pH est d'autant plus importante en cas d'inoculation de champignon MA. La croissance est, en effet, accentuée, le prélèvement en azote est également plus important. Néanmoins les variations de pH observées au cours de cette expérience étant très faibles, elles ne peuvent pas modifier la biodisponibilité des éléments dans le sol.

#### 3.4. DEVENIR DES POLLUANTS A L'ISSUE DE LA CULTURE DE LA LUZERNE

##### ■ Les HAP

L'expérience en vase de végétation menée sur les deux sols de Neuves-Maisons conduit à une réduction de la teneur en HAP quelles que soient les modalités, y compris dans les modalités non plantées. Les modalités non plantées pour le sol non traité présentent moins de HAP en fin de culture que dans les modalités en présence de plantes. Les plantes ont donc eu pour effet de limiter la biodégradation des HAP, comme dans l'expérience avec le sol d'Homécourt (chapitre II partie III). Ainsi, bien que le sol contienne des bactéries capables de dégrader les HAP, l'activité de dégradation n'a pas été plus importante en présence de plantes, ce qui peut indiquer soit une absence de stimulation des bactéries dégradantes, soit une disponibilité moindre des HAP. Bien que les dénombrements des bactéries cultivables ne renseignent que sur une faible partie de la microflore bactérienne du sol, il faut souligner que le nombre de bactéries dégradantes n'était pas plus élevé en présence de plantes dans cette expérience. L'utilisation d'autres techniques de quantification, comme les techniques de PCR en temps réel (chapitre I partie III) aurait pu permettre de confirmer cette hypothèse.

Néanmoins, la mycorhization de *Glomus intraradices* dans le sol non traité montre une tendance à davantage de biodégradation que les modalités non inoculées. Ceci mettrait donc

en évidence un effet rhizosphérique de la dégradation des HAP dans les plantes mycorhizées, déjà observé par d'autres auteurs (Joner et Leyval, 2003b). Pour le sol traité par désorption thermique, l'inoculation et la fertilisation semblent avoir agi positivement sur la dégradation des HAP bien que la colonisation mycorhizienne soit très limitée. L'apport d'éléments nutritifs a permis d'améliorer la biomasse de la luzerne. L'apport de fertilisation dans le sol traité par désorption thermique a pu également apporter une source de nutriments nécessaire aux microorganismes pour biodégrader les HAP. Toutefois, la biomasse des plantes obtenue lors de cette culture est très faible et corrélée à la quantité de sol rhizosphérique (résultats non présentés). Ainsi la faible exsudation et le faible impact de la rhizosphère ont pu limiter la biodégradation des HAP.

Les fortes teneurs en éléments métalliques dans ces sols sont également des facteurs agissant directement sur la dégradation des HAP. En effet, l'activité des enzymes du sol telles que l'uréase ou la déhydrogénase, qui aident à la dégradation des polluants organiques, est inhibée par la contamination métallique (Zheng *et al.*, 1999). Maliszewska-Kordybach et Smreczak (2003) ont montré que l'activité déhydrogénase est encore plus sensible devant une pollution combinée en ETM et HAP que lors d'une pollution de l'un ou de l'autre groupe de contaminant. Cette sensibilité dépend de l'âge de la pollution (Lock et Janssen, 2003). En effet, une contamination ancienne permet l'association des contaminants avec la matière organique (Carroll *et al.*, 1994) ou leur incorporation dans des pores du sol (Wu et Gschwend, 1986). Shen *et al.*, (2005) ont montré également que l'activité des enzymes dépendait également de la concentration en polluants. Sokhn *et al.* (2001) dans une expérience avec un sol contaminé en phénanthrène (400 mg.Kg<sup>-1</sup>) et en cuivre (70 mg.Kg<sup>-1</sup>) n'observent pas de différences significatives dans la dégradation du phénanthrène au bout de 28 jours d'incubation par rapport au témoin sans cuivre.

Comme lors de l'expérience menée sur le sol issu de l'ancien site industriel d'Homécourt, la proportion relative des différents HAP dépend du sol considéré, mais n'est ni influencée par la mycorhization ni par la fertilisation.

#### ■ Les ETM

Les teneurs en cuivre, en plomb, en zinc et en arsenic observées dans les parties aériennes de la luzerne après 37 jours de culture montrent que la présence de champignon mycorhizien a permis de réduire l'absorption de ces métaux et métalloïdes par les plantes pour le sol non traité. Ces résultats confirment les différentes études montrant l'effet bénéfique des champignons MA sur l'absorption par les plantes d'éléments métalliques

### PARTIE III - Chapitre III

#### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site de Neuves Maisons

présents en quantités toxiques dans le sol (Göhre et Paszkowski, 2006 ; Leyval et Joner, 2001 ; Weissenhorn et Leyval, 1994). Ce résultat pourrait être un effet de dilution, les plantes mycorhizées étant plus grandes que les non mycorhizées, mais certains auteurs ont aussi montré la réelle capacité des champignons MA à accumuler les métaux et à réduire leur translocation vers les parties aériennes (Joner et Leyval, 1997 ; Joner, *et al*, 2000).

Pour le sol traité par désorption thermique, les teneurs en cuivre, en plomb et en zinc dans les plantes sont plus faibles bien que ce sol ait une contamination identique à celle du sol non traité. Ces teneurs n'excèdent pas les teneurs observées dans les modalités inoculées du sol non traité. La différence entre l'absorption minérale des deux sols, aussi observée pour le fer et le magnésium (figure 40) pourrait être due à une modification de la disponibilité des ETM lors du traitement par désorption thermique, notamment à une valeur de pH plus élevée pour le sol traité. Quel que soit le sol considéré au cours de cette expérience, les quantités d'ETM mesurées dans les plantes après culture semblent comparables aux teneurs observées dans la littérature. De Gregori *et al.* (2003) ont montré que dans des sols agricoles contaminés en cuivre, arsenic et antimoine, (respectivement 12 mg.Kg<sup>-1</sup>, 36 mg.Kg<sup>-1</sup> et 0.2 mg.Kg<sup>-1</sup> extractible à l'EDTA), la luzerne prélevée *in situ* présentait dans ses parties aériennes 13 mg.Kg<sup>-1</sup> de Cu, 2,6 mg.Kg<sup>-1</sup> de As et 0,16 mg.Kg<sup>-1</sup> de Sb.

## CONCLUSION

Les résultats de cette expérience montrent que:

- (i) par rapport à l'expérience avec les sols d'Homécourt, la biomasse de la luzerne sur les sols de Neuves-Maisons est beaucoup plus réduite,
  
- (ii) la croissance de la luzerne sur le sol non traité de Neuves-Maisons est fortement dépendante de l'inoculation par *Glomus intraradices*. Cet effet est associé à une tendance à l'amélioration de la nutrition phosphatée, et à une diminution de l'absorption de Pb, As, Cu et Zn dans les parties aériennes,
  
- (iii) l'inoculation mycorhizienne dans le sol non traité a conduit à une augmentation du nombre de bactéries hétérotrophes cultivables dans la rhizosphère, mais à une diminution du nombre de bactéries dégradantes, et n'a pas eu d'effet sur la concentration en HAP dans le sol,

### PARTIE III - Chapitre III

#### Dynamique des polluants et des communautés microbiennes dans la rhizosphère de la luzerne mycorhizée ou non : cas des sols contaminés et traités du site de Neuves Maisons

(iv) en revanche, le sol traité par désorption thermique a inhibé la colonisation mycorhizienne, même si la croissance de la plante était plus élevée que dans le sol non traité (modalités NI),

(v) en fin d'expérience, la concentration résiduelle en HAP est supérieure dans les sols plantés. Comme dans l'expérience avec le sol d'Homécourt, la présence de la plante semble limiter la dissipation. Cependant, dans le sol traité par désorption thermique, la présence de la plante augmente significativement le nombre de bactéries dégradantes cultivables par rapport au sol non planté.

# PARTIE III

## CHAPITRE IV

---

Dynamique des communautés microbiennes dans  
le sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique *in situ*



parcelles lysimétriques du GISFI sur le site d'Homécourt  
contenant le sol traité et non traité de Neuves-Maisons



sol de Neuves-Maisons traité par  
désorption thermique *in situ*



## INTRODUCTION

La dynamique de recolonisation par les microorganismes de sols fortement perturbés, et de sols décontaminés est largement méconnue. Dans le premier chapitre de résultats, nous avons montré que le nombre de bactéries, estimé par les dénombrements et par la quantification de gènes, était plus faible dans le sol de Neuves-Maisons qui avait été traité par désorption thermique que dans le sol non traité, mais ce nombre évoluait au cours du temps. Dans le chapitre précédent (chapitre III partie III), nous avons montré en fin de culture un nombre plus important de bactéries dans le sol traité par désorption thermique par rapport au sol non traité, et en présence de plantes une augmentation du nombre des dégradantes dans le sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique, bien que la concentration en HAP soit faible. Cependant, les résultats obtenus au laboratoire ne sont pas nécessairement transposables à ceux rencontrés *in situ*. Le présent chapitre propose d'analyser, dans un premier temps, l'évolution de la quantité de bactéries et la structure des communautés bactériennes, au cours du temps, dans le sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique stocké à l'air libre *in situ*. La seconde partie de cette étude s'attache à analyser la quantité de bactéries et la structure des communautés bactériennes dans des parcelles lysimétriques mises en place *in situ* avec le sol de Neuves-Maisons pour connaître le potentiel bactérien de ces sols avant la mise en culture par des plantes.

### **1. STRUCTURE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET QUANTIFICATION DES BACTERIES DEGRADANTES DANS LE SOL DE NEUVES-MAISONS AU COURS DU TEMPS APRES LE TRAITEMENT PAR DESORPTION THERMIQUE**

#### 1.1. CONDUITE DE L'EXPERIENCE

Le sol issu du site industriel de Neuves-Maisons a été échantillonné le lendemain de son traitement par désorption thermique (11/10/04). Ce sol a été ensuite transporté sur le site industriel d'Homécourt où il a été stocké à l'air libre. Différents prélèvements ont été réalisés : avant et après le transport le lendemain du traitement de dépollution (ces deux prélèvements ont donc la même date) puis au cours du temps (partie II paragraphe 2.2.2.). Ces échantillons d'environ 100 g de sol ont été analysés au laboratoire, après extraction de l'ADN, par PCR-TTGE et par PCR en temps réel afin d'étudier la structure des communautés bactériennes et de quantifier les bactéries, en particulier les bactéries dégradantes. Le dénombrement de la microflore bactérienne cultivable et de la microflore cultivable dégradant

les HAP a également été effectué pour chacun des échantillons. Les analyses ont été effectuées sur un échantillon moyen par prélèvement. Les résultats n'ont donc pas pu faire l'objet d'analyses statistiques.

## 1.2. RESULTATS

### 1.2.1. Dénombrements des bactéries cultivables totales et dégradant les HAP

Les prélèvements initiaux du 11/10/04 (avant et après le transport du sol) présentent une quantité de bactéries totales identiques (figure 44). Le deuxième prélèvement du 17/06/05 montre une plus grande quantité de bactéries cultivables par rapport aux prélèvements initiaux mais également par rapport aux prélèvements réalisés ensuite. Cette différence peut être attribuée aux conditions climatiques favorables durant cette période (effet saisonnier). Ensuite, la quantité de bactéries évolue peu au cours du temps et des saisons et reste faible. Toutefois, les prélèvements suivants n'ont pas été effectués à la même période de l'année.

Le nombre de bactéries dégradant les HAP suit la même évolution que la quantité de bactéries totales (figure 44). La plupart des échantillons contiennent moins de bactéries dégradant les HAP que de bactéries totales. Le nombre de bactéries dégradant les HAP par rapport au nombre de bactéries totales n'est pas constant pour les différents prélèvements et est maximum pour le prélèvement réalisé le 17/06/05 où il dépasse même les 100 %.

Ce rapport supérieur à 100% peut être attribué aux erreurs dues à la méthode ou au fait que le dénombrement des bactéries totales et celui des bactéries dégradant les HAP ont été réalisés par deux méthodes distinctes. Quoiqu'il en soit, la valeur de 125 % reflète que, pour cet échantillon, la majeure partie des bactéries contenues dans le sol est capable de dégrader les HAP.

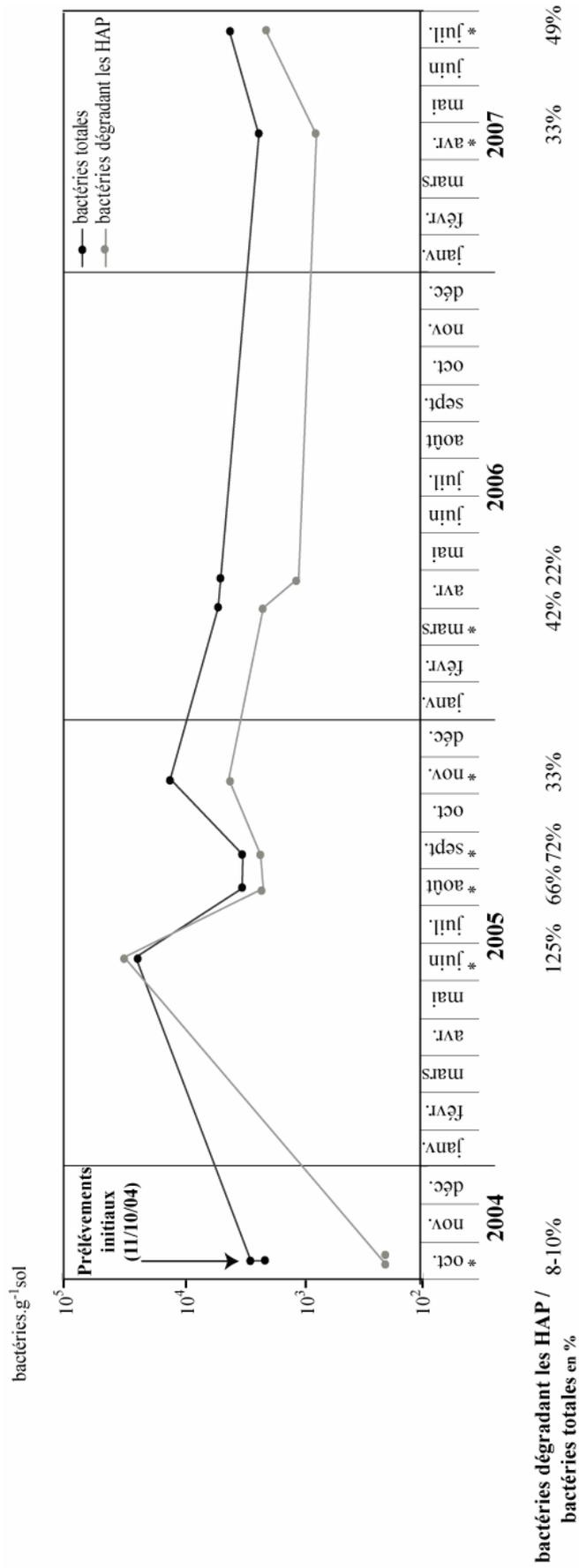


Figure 44 : Nombre de bactéries cultivables et dégradant les HAP dans le sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique prélevé *in situ* au cours du temps et pourcentage de bactéries dégradant les HAP par rapport aux bactéries totales.

Les prélèvements sont indiqués par des \*.

### 1.2.2. Quantification des gènes 16S et des gènes de dégradation des HAP

L'analyse par PCR en temps réel des échantillons prélevés *in situ* au cours du temps (figure 45) montre que le nombre de copies de gène 16S varie entre les différents échantillons. Le nombre de copies de gène 16S n'a pas pu être déterminé pour les deux prélèvements initiaux (11/10/04) car la faible quantité d'ADN contenu dans ces échantillons est en dessous de la limite de détection de la PCR en temps réel. Comme pour les dénombrements bactériens en microplaques (figure 44), l'échantillon prélevé le 17/06/05 présente le nombre de copies de gène 16S le plus important. On peut noter ensuite une diminution et des variations qui pourraient indiquer un effet saisonnier. Le nombre de copies de NDO pour les bactéries Gram – est aussi le plus élevé lors du prélèvement de juin 2005 puis tend à diminuer, alors que le nombre de copies de NDO pour les Gram + varie davantage en fonction des prélèvements.

Le rapport entre le nombre de copies de gène de NDO par rapport au nombre de copie de gène 16S (figure 46) confirme la variabilité des échantillons et montre la dominance des bactéries dégradantes Gram – sauf pour l'échantillon de novembre 2005 et les échantillons d'avril et juillet 2007, où ce sont les Gram+ qui dominent, aussi suggérant un possible effet saisonnier. Ce rapport n'excède pas 0,1 % pour les bactéries Gram – et Gram +, indiquant ainsi la faible part du nombre de bactéries dégradantes par rapport au nombre de bactéries totales.

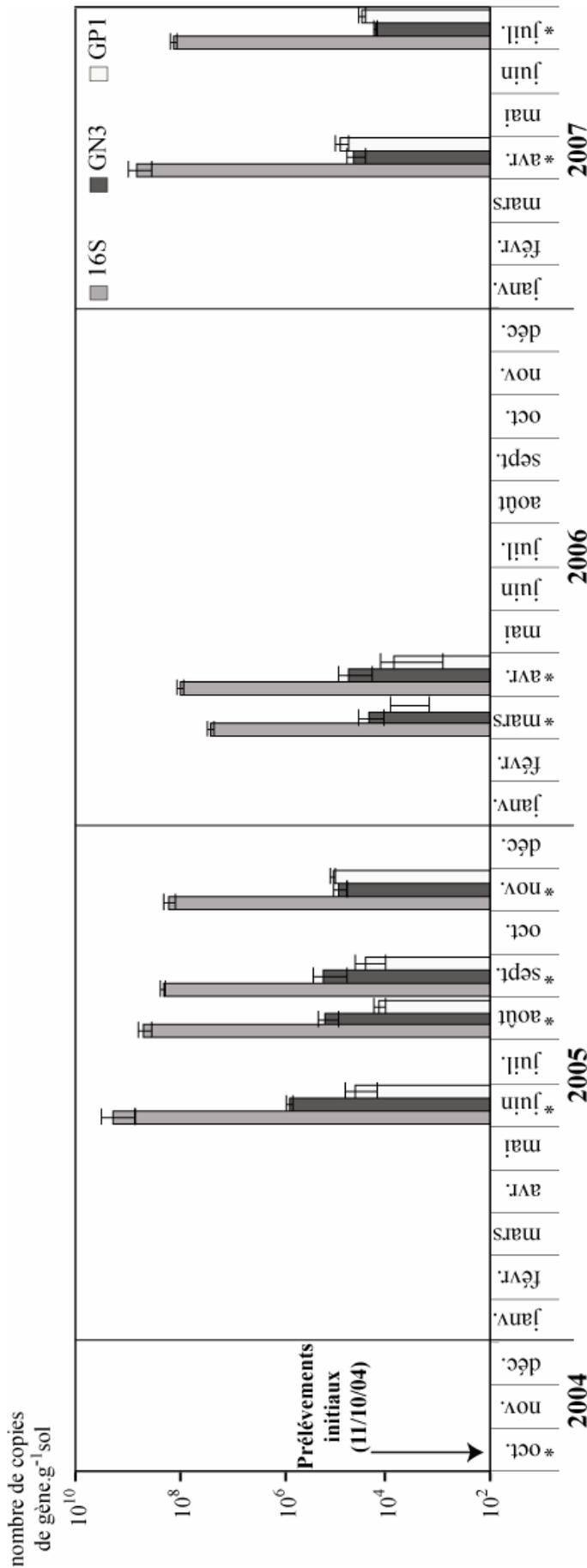


Figure 45 : Nombre de copies de gène 16S et gène de naphthalène dioxygénase (NDO) pour les bactéries Gram + (GPI) et les bactéries Gram - (GN3) obtenus par technique de PCR en temps réel pour le sol de Neuves-Maisons traité prélevé *in situ* au cours du temps après traitement par désorption thermique.

Les barres présentent les erreurs standard des répliquats d'analyses (n=3). Les prélèvements sont indiqués par des \*.

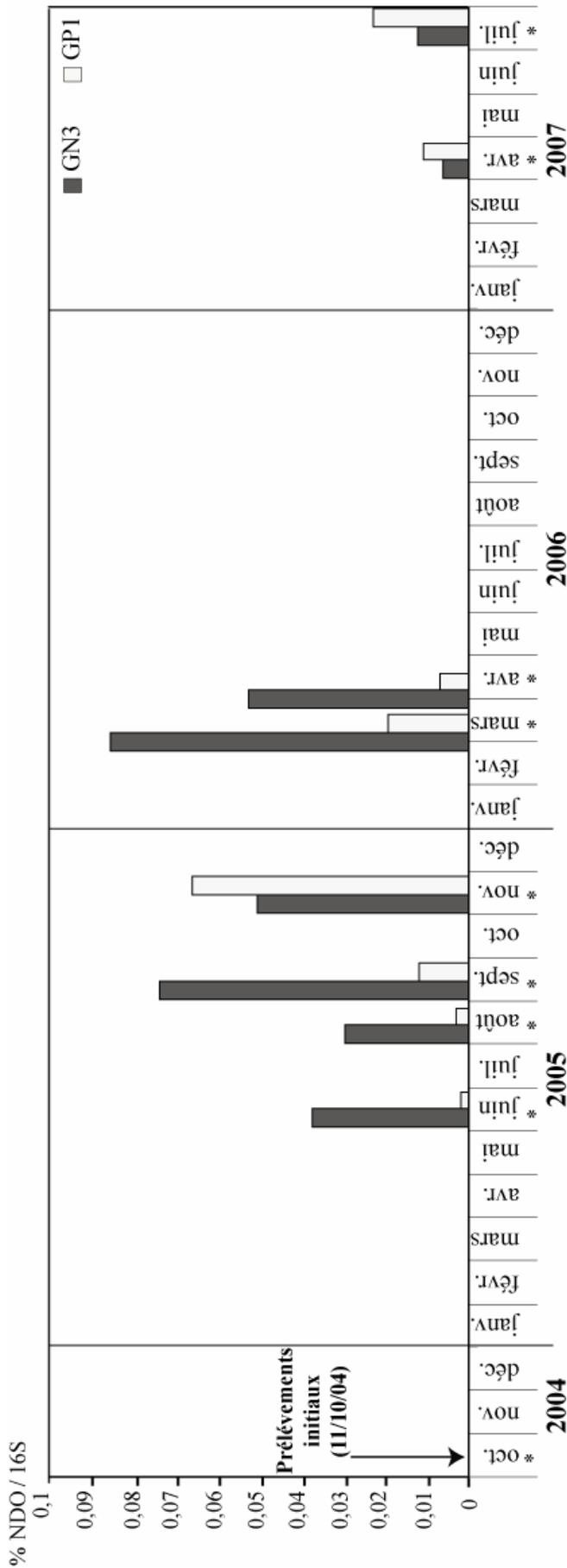
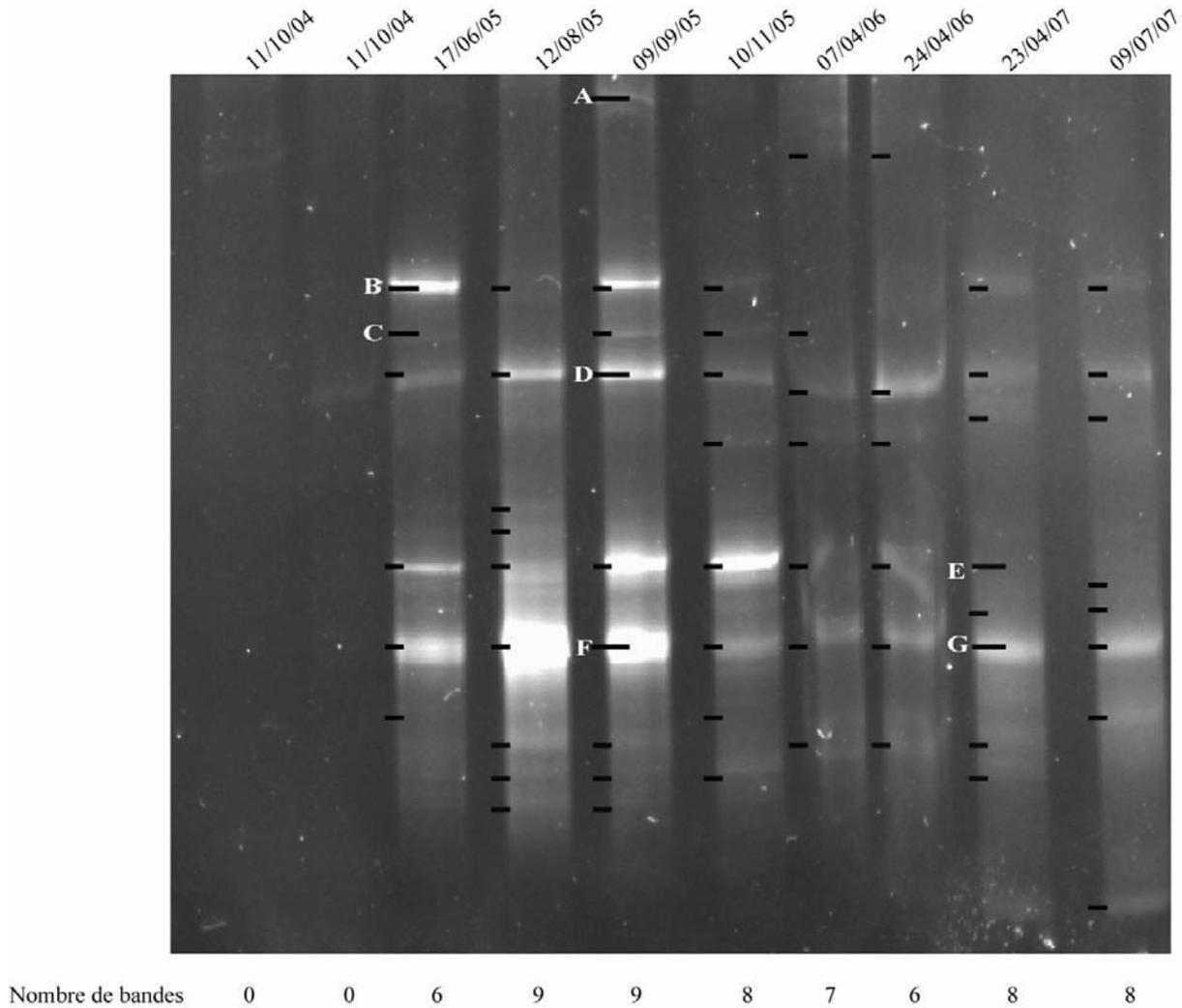


Figure 46: Rapports entre le nombre de copies de gène de naphthalène dioxygénase (NDO) pour les bactéries Gram + (GPI) et Gram - (GN3) et le nombre de copies de gène bactérien total 16S obtenus par technique de PCR en temps réel pour le sol de Neuves-Maisons traité prélevé *in situ* au cours du temps après traitement par désorption thermique.

Les prélèvements sont indiqués par des \*.

### 1.2.3. Analyse de la structure des communautés bactériennes



**Figure 47 : Gel de TTGE montrant les différents profils obtenus par les techniques de PCR-TTGE sur l'ADNr 16S dans le sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique prélevé *in situ* au cours du temps.**

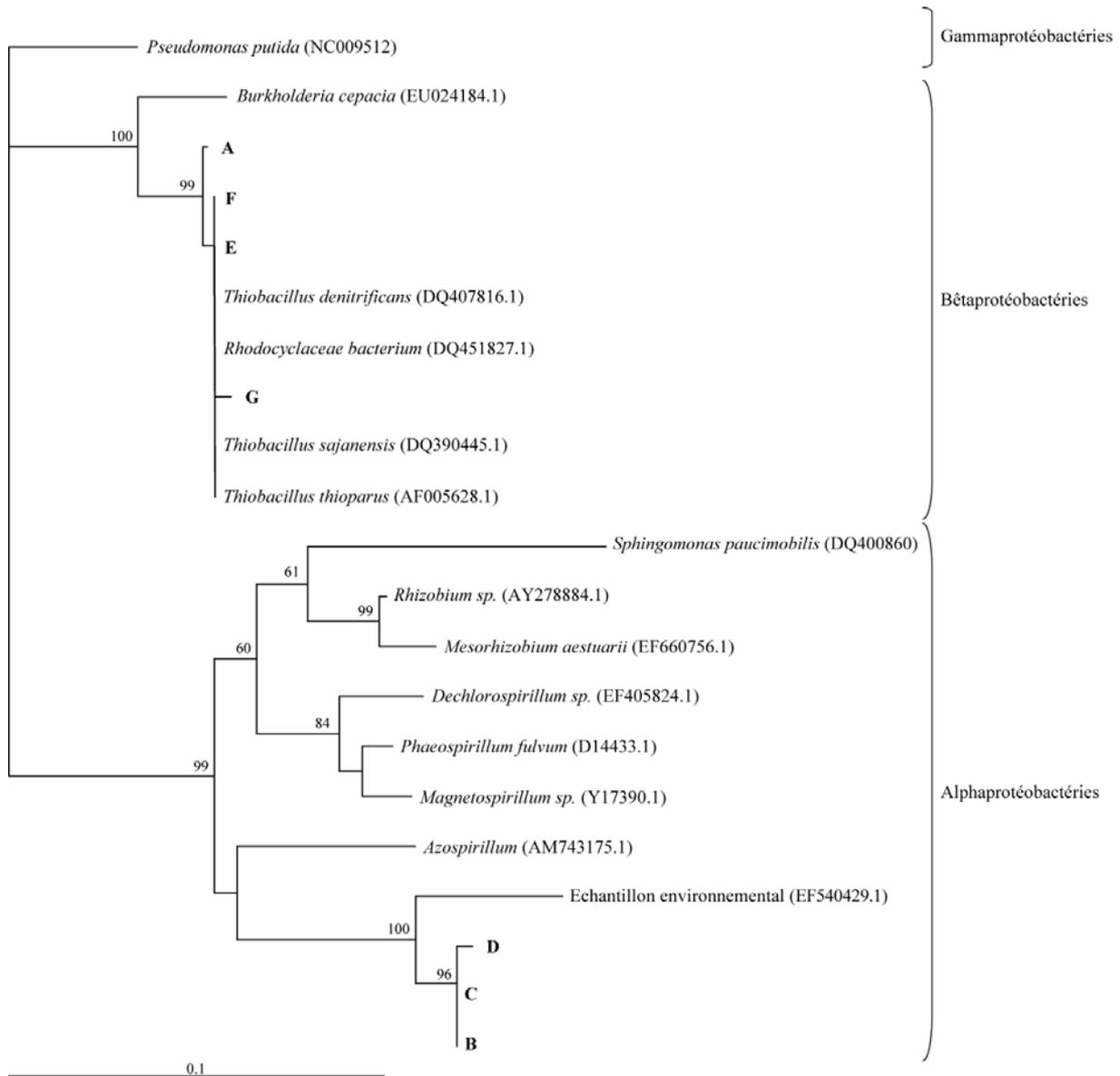
Les bandes présentes sont indiquées par des traits et celles séquencées sont indiquées par des lettres différentes.

L'empreinte moléculaire obtenue par PCR-TTGE, présentée dans la figure 47, illustre l'évolution de la structure des communautés bactériennes dans le sol traité par désorption thermique dans l'ensemble des prélèvements au cours du temps. Pour les deux échantillons prélevés le lendemain du traitement (11/10/04) la quantité d'ADN obtenue était faible et, même après amplification par PCR, il n'a pas été possible d'obtenir suffisamment de produit de PCR. Le nombre de bandes visibles pour chacun des échantillons varie peu au cours du temps. Du point de vue de la diversité, les profils de bandes ou d'espèces ne montrent pas de modifications majeures dans ces différents échantillons.

Les bandes principales présentant les plus fortes intensités sur le gel obtenu par PCR-TTGE ont été séquencées. L'ensemble de ces 7 bandes présentées dans un arbre

phylogénétique (figure 48) appartient au groupe des protéobactéries, notamment les bêta- et les alpha-protéobactéries.

Les bandes E, F et G situées en bas du gel de TTGE (figure 47) sont des séquences d'ADN appartenant à un groupe phylogénétique de bêta-protéobactéries et présentent 100 % d'analogie avec le genre *Thiobacillus* lorsqu'elles sont comparées aux banques de données de Genbank (par BLASTn, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (figure 48). La bande A, quant à elle, présente une séquence d'ADN qui appartient également aux bêta-protéobactéries et qui présente 99% d'homologie avec *Thiobacillus denitrificans*. Il est possible que cette bande A située en haut de gel ne soit qu'un artefact dû à la technique de TTGE. En effet, d'autres bandes situées dans la partie supérieure du gel de TTGE ont montré, après séquençage, qu'il s'agissait de chimère ou d'hétéroduplex n'ayant pas migré correctement dans le gel. Les bandes B, C et D, situées dans la partie haute du gel, représentent des séquences d'ADN appartenant au groupe phylogénétique des alpha-protéobactéries. Elle présentent 99 % d'analogie avec une séquence d'ADNr 16S d'un clone environnemental (EF540429.1) issu d'un sol provenant d'un site contaminé par du charbon (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).



**Figure 48 : Arbre phylogénétique basé sur l'alignement des séquences de l'ADNr 16S pour les bactéries présentes dans le sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique prélevé *in situ* au cours du temps.**

L'analyse par neighbor joining montre la position des séquences correspondant aux bandes de TTGE analysées (figure 3) vis-à-vis de différentes espèces de bactéries référencées dans GENEBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). L'arbre a été ancré avec la séquence d'ADNr 16S de l'espèce *Pseudomonas putida* (NC009512). L'échelle représente 10% de variation de séquence et les valeurs de bootstrap de l'analyse (n=100) sont indiquées lorsqu'elles sont supérieures à 60%. Les numéros d'accès des bactéries de références sont donnés entre parenthèse.

Comme le gel obtenu par TTGE (figure 47) le montre, le nombre et le type de bandes obtenues au cours du temps varie peu. L'analyse par ACP des profils des communautés bactériennes obtenus par TTGE montre une répartition nette des profils de communautés des différents échantillons autour des deux axes principaux qui expliquent respectivement 38 et 26% de la variance (figure 49) mais les communautés bactériennes ne semblent pas se différencier selon des critères de temps ou de saison.

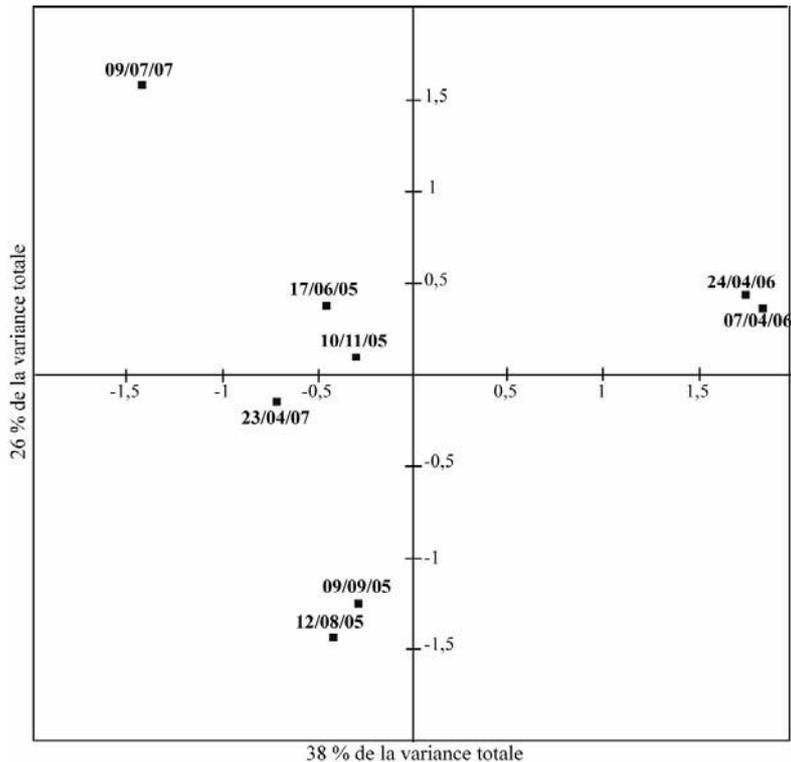


Figure 49 : Analyse par ACP des profils des communautés bactériennes obtenus par TTGE dans le sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique prélevé *in situ* au cours du temps.

## 2. STRUCTURE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET QUANTIFICATION DES BACTERIES DEGRADANTES POUR LE SOL DE NEUVES-MAISONS *IN SITU*

### 2.1. CONDUITE DE L'EXPERIENCE

Le sol issu du site industriel de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique a été utilisé pour la mise en place de parcelles lysimétriques (septembre 2005) sur le site expérimental du GISFI situé à Homécourt (partie II paragraphe 1.2.).

Un échantillonnage initial a été réalisé ( $t_0$ ) sur les 24 parcelles dont quatre contiennent le sol traité par désorption thermique afin de connaître le potentiel biologique initial de ces sols. Ces sols ont été analysés au laboratoire par PCR-TTGE et PCR en temps réel, après extraction de l'ADN afin de déterminer la quantité de bactéries et la structure des communautés bactériennes des sols des parcelles lysimétriques avant une culture de plantes.

**Remarque :** Le sol de Neuves-Maisons non traité et le sol traité par désorption thermique ont été transportés du site de Neuves-Maisons au site d'Homécourt en octobre 2004. Ces sols ont été stockés sur le site d'Homécourt jusqu'à l'installation des parcelles

lysimétriques en septembre 2005, date considérée comme  $t_0$  de ces parcelles. Le prélèvement du 09/09/05 étudié dans la première partie de ce chapitre est équivalent au  $t_0$  des parcelles lysimétriques.

## 2.2. RESULTATS

### 2.2.1. Quantification des gènes 16S et des gènes de dégradation des HAP

Le nombre de copies de gène 16S analysé par PCR en temps réel sur l'ensemble des sols des parcelles lysimétriques présente une hétérogénéité entre les répétitions tant pour le sol non traité que pour le sol traité par désorption thermique (figure 50). Cette hétérogénéité conduit également à un nombre de copies de gènes de NDO variable selon l'échantillon. Le rapport du nombre de copies de gène de NDO par rapport au nombre de copies de gène 16S (figure 51) montre que les sols non traités et traités contiennent sensiblement plus de bactéries dégradantes Gram – que de Gram+. Ils montrent surtout que le pourcentage de bactéries possédant le gène NDO est assez faible (moins de 2 %) dans le sol non traité mais est encore plus faible dans le sol traité par désorption thermique (<0,2%).

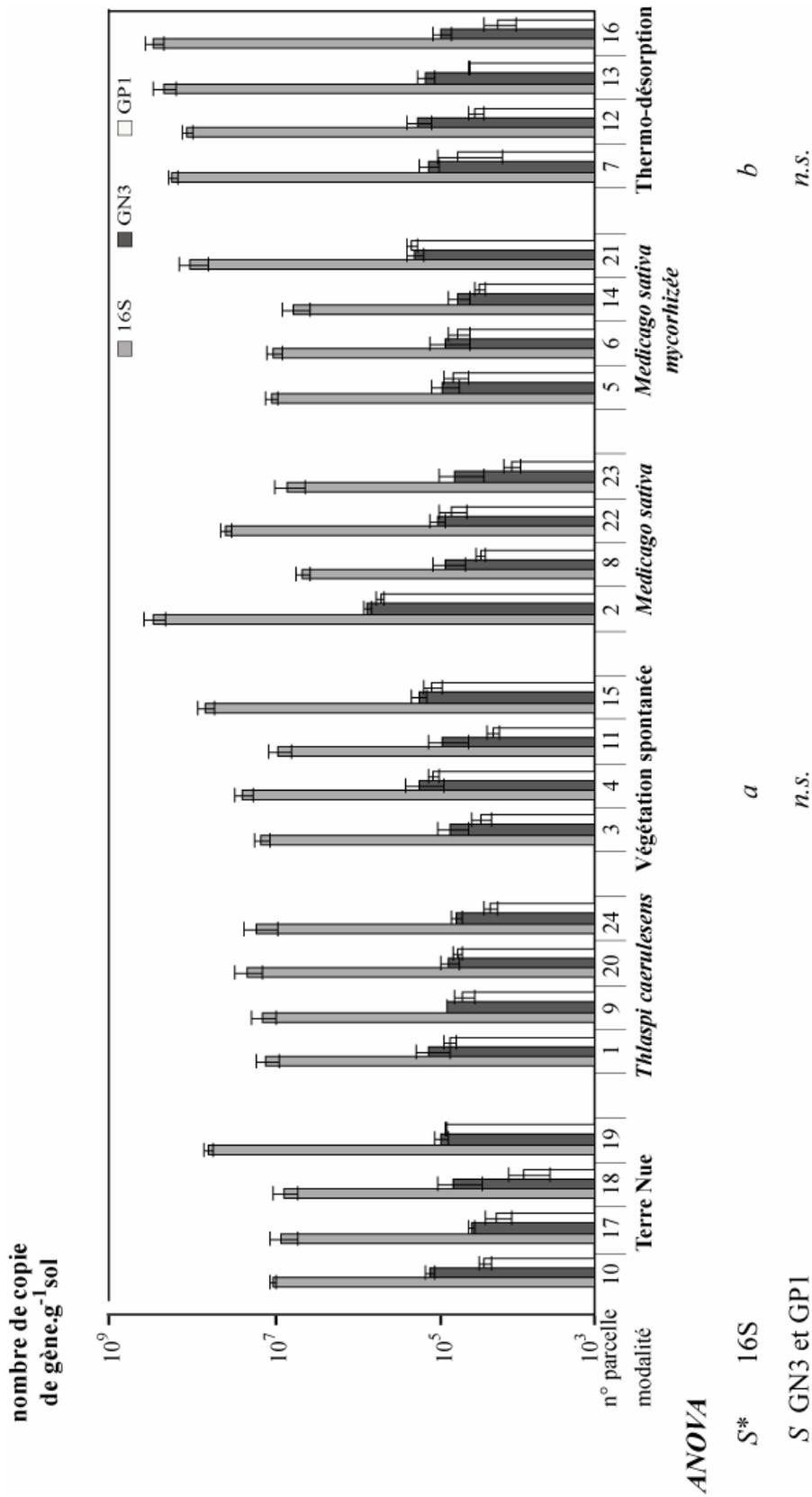


Figure 50 : Nombre de copies de gène 16S, de gène NDO pour les bactéries Gram + (GPI) et les bactéries Gram – (GN3) obtenues par technique de PCR en temps réel sur le sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique prélevé à  $t_0$  sur les parcelles lysimétriques (les numéros des parcelles et les modalités sont détaillées dans la partie II). Les barres présentent les erreurs standard des réplicats d'analyses (n=3).

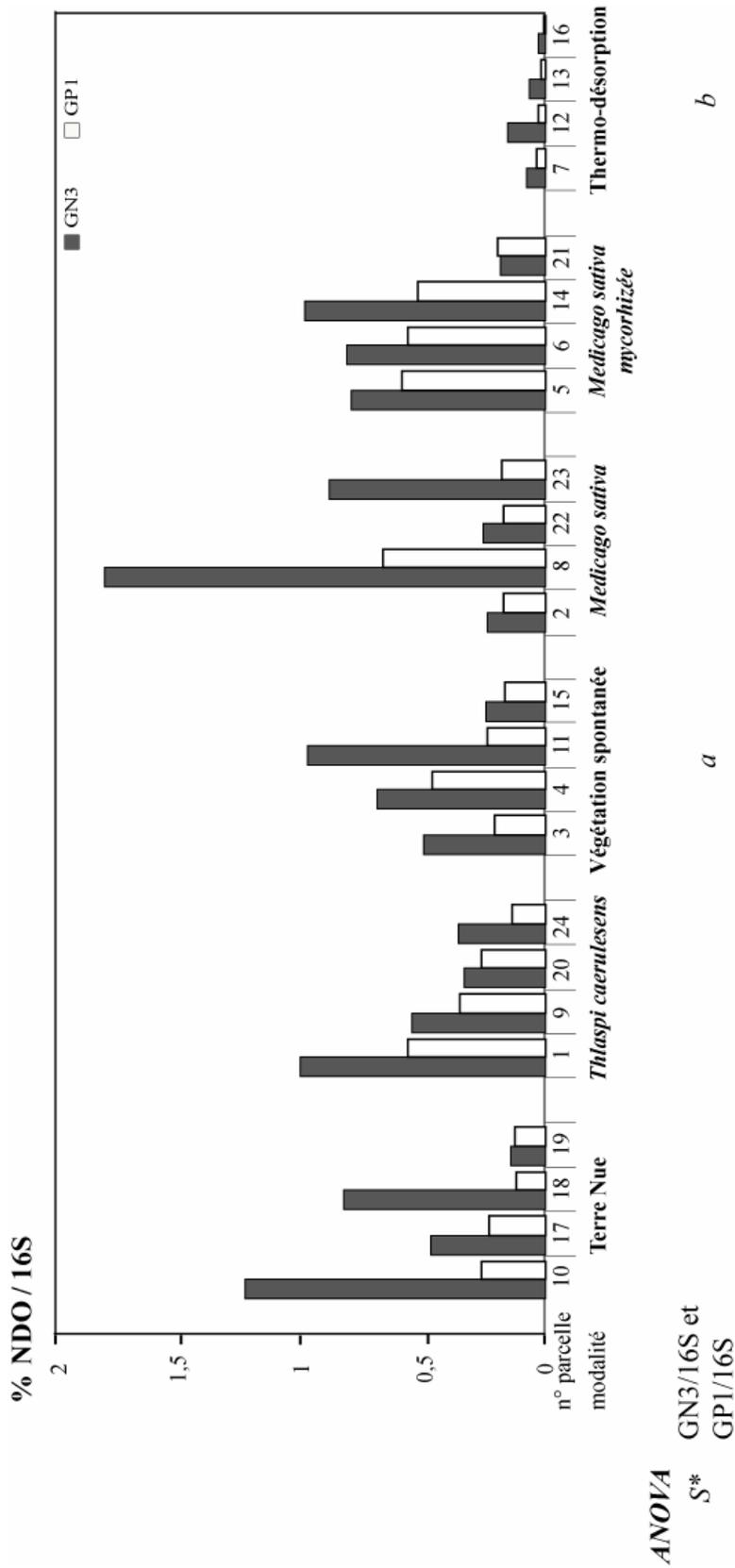


Figure 51 : Rapport entre le nombre de copies gène de NDO pour les bactéries Gram + (GN3) et Gram - (GPI) et le nombre de copies de gène 16S obtenues par technique de PCR en temps réel sur le sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique prélevé à  $t_0$  sur les parcelles.

### 2.2.2. Analyse de la structure des communautés bactériennes

Les profils des communautés bactériennes des quatre répétitions (parcelles contenant le sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique) sont présentés dans la figure 52. Cette figure montre qu'il n'existe pas de grande variabilité d'une parcelle à l'autre pour le sol non traité. Les deux sols ont des structures des communautés différentes, et le sol traité par désorption thermique présente un profil de bandes moins riche.

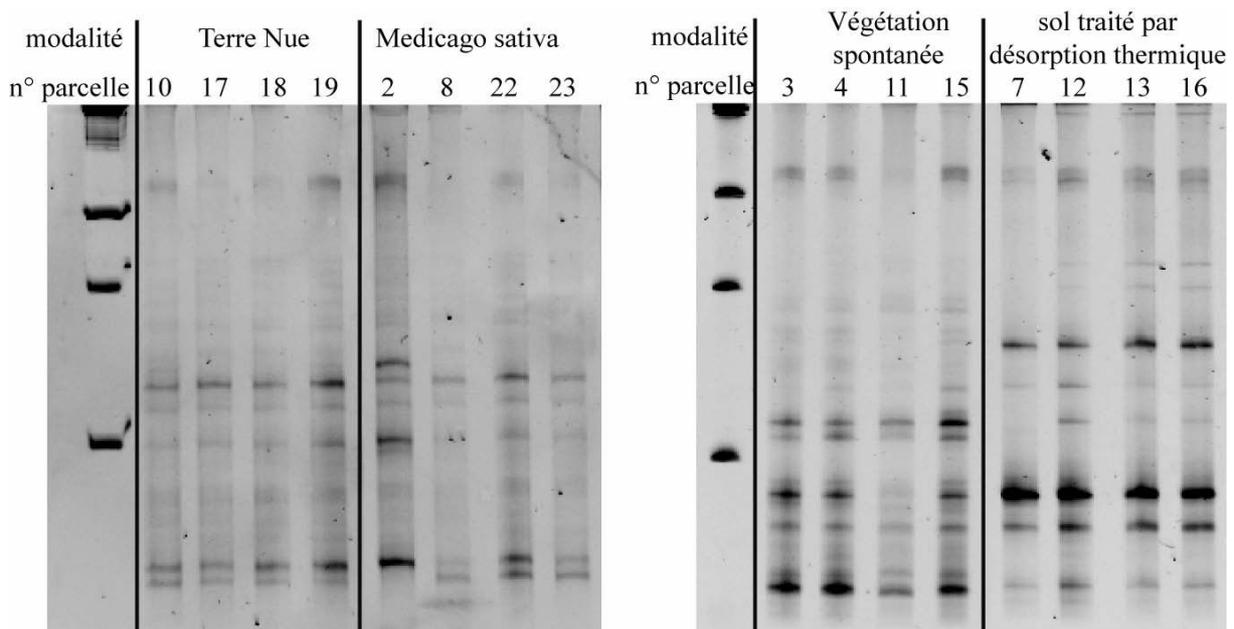


Figure 52 : Gels de TTGE montrant les différents profils obtenus par les techniques de PCR-TTGE sur l'ADN 16S dans les parcelles de sol de Neuves-Maisons non traité et traité par désorption thermique prélevé à  $t_0$ .

## 3. DISCUSSION

### 3.1. DIVERSITE ET RICHESSE BACTERIENNE DANS LE SOL DE NEUVES-MAISONS TRAITE PAR DESORPTION THERMIQUE

#### 3.1.1. Prélèvements initiaux

La présence de bactéries dans les prélèvements initiaux du 11/10/04 a été mise en évidence uniquement dans les dénombrements bactériens en microplaques (figure 44) mais non dans les analyses moléculaires de ces échantillons. Cette différence peut avoir plusieurs origines et en premier lieu, la différence de sensibilité des techniques de dénombrement et des techniques moléculaires (la limite de détection de cette méthode étant de  $10^2$  copies.g<sup>-1</sup> sol Cebren *et al.*, *in press*). En effet, l'extraction d'ADN de ces prélèvements initiaux n'a pas pu mettre en évidence d'ADN dans ces sols. Il est possible que ces sols, traités la veille du

prélèvement, aient subi des modifications qui ont pu freiner l'extraction d'ADN. Pour les échantillons prélevés ensuite, ces perturbations dues au traitement par la désorption thermique ont pu se stabiliser permettant alors les analyses moléculaires. D'autre part, la sensibilité de la méthode de dénombrement bactérien en microplaques est directement corrélée à la quantité de bactéries cultivables présentes dans l'échantillon. Ainsi, dans le cas d'une microflore bactérienne peu importante, les valeurs obtenues sont données à  $10^2$  bactéries près (Mustin, communication personnelle).

### 3.1.2. Richesse bactérienne

Dès le lendemain du traitement par désorption thermique, le sol de Neuves-Maisons traité n'était pas totalement stérile. Le refroidissement des sols avec de l'eau de la rivière (Moselle) peut contribuer à expliquer la présence de bactéries dans les prélèvements initiaux, mais ces nombres restent faibles.

Les échantillonnages effectués au cours du temps montrent que ce sol ne restaure pas une microflore bactérienne très importante. En effet, le dénombrement bactérien en microplaque (figure 44) montre une faible quantité de bactéries qui n'augmente pas au cours des trois ans de prélèvement. Les bactéries contenues dans ce sol semblent, en effet, seulement se maintenir. Le sol renferme très peu de bactéries cultivables par rapport à d'autres sols contaminés. Joner *et al.* (2002), avec la même technique de dénombrement bactérien, trouvent, en effet, de l'ordre de  $10^7$  bactéries totales dans un sol de cokerie contaminé en HAP.

Cette quantité de bactéries mesurée ici est du même ordre de grandeur que celle observée dans des sols contaminés. Cependant, elle est plus faible que celle mesurée dans un sol non contaminé, par exemple un sol agricole pouvant contenir de l'ordre de  $10^9$ - $10^{11}$  copies de gène 16S (Lopez-Gutierrez *et al.*, 2004).

Les techniques de dénombrement en microplaques et les techniques moléculaires n'estiment pas la même quantité de bactéries, cette différence pouvant être attribuée au fait que dans le premier cas les valeurs obtenues reflètent seulement les bactéries cultivables. En effet, de nombreux auteurs estiment que 80-99% des bactéries du sol ne sont pas cultivables (Alexander, 1977 ; Borneman *et al.*, 1996 ; Giller *et al.*, 1997). Ainsi la culture de bactéries en microplaque serait peu représentative des variations génotypiques et phénotypiques des bactéries du sol (Rondon *et al.*, 2000) tandis que les analyses moléculaires se basent sur un plus large pool de bactéries. De plus une petite quantité de l'ADN mesuré peut être issu d'organismes venant de mourir, augmentant encore le nombre de copies de gène 16S mesuré. De plus, la différence observée entre la quantité de bactéries cultivables mesurées en

microplaques et la quantité mesurée par PCR en temps réel peut être attribuée au fait que la microflore présente dans le sol traité par désorption thermique a subi un stress au cours du traitement du sol, réduisant alors le potentiel de ces bactéries à être cultivées (présence de bactéries viables mais non cultivables (BVNC)).

Les dénombrements et la quantification des gènes montrent les valeurs les plus élevées de bactéries dégradantes lors du prélèvement de juin 2005. Ceci pourrait être lié à un effet saisonnier (période de forte activité microbienne), mais n'a pas été retrouvé par la suite, ou à une dynamique de colonisation particulière qui n'aurait pas été mise en évidence en l'absence de prélèvements entre octobre 2004 et juin 2005. Ainsi, des prélèvements plus réguliers et systématiquement aux mêmes périodes aurait pu fournir des informations complémentaires sur la dynamique de recolonisation après le traitement par désorption thermique.

### 3.1.3. Diversité bactérienne

La quantité et la proportion de bactéries dégradant les HAP dénombrées en microplaque n'évolue pas au cours du temps. Comme pour le nombre de bactéries totales, les bactéries dégradantes semblent uniquement se maintenir dans le sol (figure 44). Pour Johnsen et Karlson (2005) il existe une corrélation entre le nombre de bactéries dégradant les HAP et la quantité de HAP dans le sol. La faible concentration résiduelle en HAP après désorption thermique (100 mg.Kg<sup>-1</sup> d'HAP totaux) pourrait expliquer ce résultat. Cependant, nos résultats (chapitre I partie III) ne montrent pas de corrélation entre la teneur en HAP et le pourcentage de bactéries dégradantes.

L'analyse moléculaire des gènes de NDO mène à la même conclusion (figures 45 et 46). Cette analyse montre des variations au cours du temps du pourcentage relatif de bactéries dégradantes Gram - et Gram +, mais elle montre surtout un faible pourcentage de bactéries dégradantes. Park et Crowley (2006) ont dénombré 10<sup>7</sup> copies.g<sup>-1</sup> sol du gène *nahAC* codant la NDO 6 jours après avoir contaminé un sol avec 30 mg.Kg<sup>-1</sup> de naphthalène. Le sol initial non contaminé contenait 5.10<sup>3</sup> copies.g<sup>-1</sup> sol du gène de *nahAC*. Cependant, dans ce cas, il s'agissait d'une contamination artificielle et récente avec un seul HAP, qui était sans doute très disponible. On peut noter ici un nombre de copies de gène un peu inférieur avec une contamination ancienne et résiduelle après un traitement de décontamination.

L'analyse par PCR-TTGE (figure 47) montre, elle aussi, que le temps ne modifie pas significativement les communautés bactériennes. Ces dernières sont principalement des protéobactéries, c'est-à-dire des bactéries Gram - (figure 48), proches du genre *Thiobacillus*

et de bactéries présentes dans des sites contaminés (numéro d'accès GENE BANK EF540429.1). Ainsi, les bactéries majoritaires contenues dans ce sol (c'est-à-dire celles qui seront les plus visibles par des techniques de PCR-TTGE) sont Gram -. Cependant ces analyses montrent toutes les deux une faible diversité bactérienne dans ce sol. En effet, Filion *et al.* (2004) ont dénombré, par clonage et séquençage de l'ARN, près de 80 espèces bactériennes différentes appartenant à 13 groupes bactériens dans la rhizosphère de *Picea mariana*. Ces auteurs montrent que 27% des bactéries recensées, avec un jeu d'amorces identiques à celles utilisées au cours de ce travail, sont des protéobactéries. La pauvreté bactérienne du sol traité par désorption thermique étudié tient au fait que ce sol est exempt de plantes mais également qu'il offre des conditions difficiles aux organismes qui peuvent s'y trouver. Comme dans toutes successions biologiques, seuls des organismes adaptés peuvent survivre dans ce milieu contraignant. Les organismes pionniers sont ainsi peu nombreux et peu diversifiés (Prach et Pyšek, 2001).

La présence de métaux peut affecter la structure et les fonctions des communautés bactériennes (Giller *et al.*, 1998 ; Sandaa *et al.*, 1999). La présence d'ETM pourrait conduire à davantage de bactéries Gram - (Bååth, 1989, Kozdrój et Van Elsas, 2000). En effet, les alpha-protéobactéries auraient plus de facilités à résister à la présence d'ETM. Ainsi, la prédominance des bactéries Gram - observées par les techniques de PCR-TTGE pourrait être liée à la contamination du sol en ETM.

Saul *et al.* (2005) ont mis en évidence également la prédominance des protéobactéries avec un « gamma shift » pour les sols contaminés en HAP. Ce « gamma shift » résulterait du fait que les gamma-protéobactéries sont davantage capable de dégrader les HAP que les bactéries des autres groupes (Watanabe *et al.*, 2000). Les bactéries mises en évidence par TTGE sont des alpha-protéobactéries et des bêta-protéobactéries moins connues pour dégrader les HAP.

Le genre *Thiobacillus* est connu pour oxyder de façon autotrophe des composés sulfurés (Popp *et al.*, 2006). Même si la plupart des espèces de ce genre sont autotrophes, certaines espèces peuvent être mixotrophes pour l'azote (Kelly *et al.*, 2005). Leur métabolisme se réalise en général en condition de pH neutre voire bas et en conditions anaérobies. Mulligan *et al.* (2001) montrent que les bactéries du genre *Thiobacillus* sp. peuvent utiliser le cuivre, le zinc, l'or et l'uranium. Les bactéries proches de ce genre *Thiobacillus* trouvées dans les analyses par PCR-TTGE pourraient ainsi avoir la capacité de modifier le statut des éléments métalliques encore présents en grande quantité dans ce sol. Du

reste, leur statut autotrophique pourrait être un avantage sérieux pour se maintenir dans un sol ayant été traité par désorption thermique.

#### 3.1.4. Limites des méthodes utilisées

Comme pour le dénombrement bactérien en microplaques, les techniques de PCR-TTGE et de PCR en temps réel ont leurs limites et leurs biais qui peuvent contribuer à expliquer les différences observées. Notons, par exemple, que, même si l'analyse microbiologique des prélèvements initiaux de l'analyse du sol traité par désorption thermique au cours du temps montre la présence de bactéries, la quantité d'ADN extraite semble insuffisante pour être visualisable par les techniques de PCR-TTGE.

Les analyses par électrophorèse à gradient chimique ou de température, basées sur le même principe, conduisent à des profils de bandes sur gel d'acrylamide où une bande correspond à une séquence d'ADN unique (Muyzer *et al.*, 1995). Ces techniques permettent de séparer des séquences ayant une paire de base de différence (Miller *et al.*, 1999 et Kirk *et al.*, 2004). Cependant, il est possible d'observer sur le gel des bandes qui regroupent plusieurs séquences (Kowalchuk *et al.*, 1997). Ces artéfacts (autrement appelés hétéroduplex ou chimères) observés par la méthode de TTGE sont dus à la PCR réalisée au préalable et peuvent avoir plusieurs origines : la recombinaison de deux séquences artificiellement durant la PCR à l'issue d'une élongation incomplète des amorces, la synthèse incomplète des brins d'ADN, des nucléotides mal assortis se liant entre eux lors de l'élongation, la Taq polymérase qui arrête sa progression sur le brin d'ADN complémentaire, la persistance de régions double brin qui empêche la réplication de l'ADN, des dommages sur l'ADN, etc. (Meyerhans *et al.*, 1990 ; Barns *et al.*, 1994 ; Choi *et al.*, 1994 ; Kopczynski *et al.*, 1994 ; Pääbo *et al.*, 1990). Afin de confirmer ou infirmer que les bandes visibles sur les gels de TTGE ne sont pas des chimères, qui peuvent représenter de 4 à 20 % des bandes observées selon Bornemann *et al.* (1996), différentes approches sont possibles et se basent sur des techniques de transcription inverse, du clonage ou encore du séquençage des bandes (Kowalchuk *et al.*, 1997 ; Watanabe *et al.*, 1998).

Une fois la confirmation faite que les bandes observées ne sont pas des chimères, il est possible de faire correspondre l'intensité des bandes et l'abondance de la séquence correspondant à la bande observée dans la population (Murray *et al.*, 1996).

En amont de la migration des séquences d'ADN sur la TTGE et de la PCR, l'extraction de l'ADN à partir de l'échantillon étudié est déterminante. En effet, si cette

extraction est trop ménagée, seul l'ADN des bactéries Gram – est obtenu car ce sont les seules à être lysées. En revanche, si la méthode d'extraction de l'ADN est trop forte, l'ADN des bactéries Gram + et des bactéries Gram – peut être extrait, au risque de causer des dommages sur l'ADN, provoquant ensuite des problèmes d'amplification des séquences par PCR (Wintzingerode *et al.*, 1997). Ainsi les observations des gels obtenus par les techniques de PCR-TTGE dépendent de la technique d'extraction de l'ADN utilisée, qui doit être optimisée pour extraire le maximum d'ADN de l'échantillon de sol, ayant le meilleur rendement (Theron et Cloete, 2000), tout en préservant l'ADN et en éliminant également les substances inhibitrices comme les acides humiques présents dans le sol (Kirk *et al.*, 2004). De la même façon, la PCR doit être optimisée afin de réduire au maximum les biais visualisés sur les gels de TTGE (Wintzingerode *et al.*, 1997).

MacNaughton *et al.* (1999) estiment que la DGGE permet de détecter les espèces présentes à plus de 1 à 2 % dans un échantillon environnemental. Pour leurs parts, Muyzer *et al.* (1993) et Murray *et al.* (1996) considèrent que des populations présentes entre 0,1 et 1 % au sein d'un échantillon peuvent être détectées par ces techniques d'électrophorèse et que ce sont les populations dominantes qui seront davantage analysées par cette technique.

La PCR en temps réel peut également être limitée par la formation d'hétéroduplex (Freeman *et al.*, 1999). Sa reproductivité dépend du nombre de copies présentes dans l'échantillon. En effet, plus le nombre de copies est faible plus les variations peuvent être importantes (18 % pour 100 copies par tube contre 6,4 % pour 10 000 copies par tube). La mise en place de la courbe standard peut être également une source d'erreur (Ginzinger, 2002) ceci étant d'autant plus vrai dans les échantillons environnementaux. Cette technique rapide qu'est la PCR traditionnelle est basée sur une analyse quantitative mais est cependant limitée par le jeu d'amorces utilisé.

Quelles que soient les techniques utilisées pour quantifier la microflore bactérienne, les tendances observées dans cette expérience vont dans le même sens, même si dans l'absolu, les quantités de bactéries mesurées divergent d'une technique à l'autre. Du reste, les méthodes moléculaires utilisées reposent sur l'analyse de l'ADN, présentant ainsi le potentiel des bactéries pour la dégradation des HAP. Le dénombrement des bactéries capable de dégrader les HAP permet de mettre en évidence la quantité de bactéries dégradant effectivement les HAP. Afin de permettre une comparaison plus précise des techniques de dénombrements en microplaques avec les analyses moléculaires, ces dernières devraient analyser non pas l'ADN mais l'ARN bactérien qui mettrait en évidence le génome des bactéries actives.

L'ensemble des analyses réalisées sur les prélèvements au cours du temps du sol traité par désorption thermique montre que ce sol évolue peu microbiologiquement. Sur le terrain, ce sol est à l'air libre. La végétation se trouvant à proximité du site de stockage ne commence à coloniser ce sol qu'au bout de 3 ans et dans une faible mesure. Ainsi, ce sol ne semble pas favorable à une recolonisation naturelle des plantes. De plus, le sol d'Homécourt traité par désorption thermique, qui a été remis sur le même site que le sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique ne présente pas non plus une forte recolonisation par les végétaux. Il semblerait que le traitement de ces sols ait modifié profondément leur potentiel biologique.

Malgré tout, les expériences précédentes (chapitres II et III partie III) ont montré que la culture sur ces sols était possible. Cependant, les biomasses obtenues sont restées très faibles avec moins de 0,5 g de luzerne en matière sèche par pot (0,07 g.Kg<sup>-1</sup>sol) après 37 jours de culture pour le sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique, et ce malgré un pourcentage de germination de la luzerne de 76 % (chapitre I partie I).

### 3.2. SOL DE NEUVES-MAISONS NON TRAITE ET TRAITE PAR DESORPTION THERMIQUE EN PARCELLES LYSIMETRIQUES

L'analyse du prélèvement initial ( $t_0$ ) des parcelles lysimétriques révèle que les 4 répétitions des différentes modalités sont hétérogènes (figures 50 et 51) que se soit le sol non traité ou le sol traité par désorption thermique. Compte tenu de ces variations, le nombre de copies de gène 16S présente peu de différence entre les deux sols. Cette hétérogénéité peut être due à l'échantillonnage des sols et l'extraction de l'ADN qui a suivi.

Les communautés bactériennes dans les différentes répétitions pour le sol non traité sont homogènes (figure 52) mais différent tant en nombre qu'en structure comparativement à celle du sol traité par désorption thermique.

Le sol de Neuves-Maisons avant et après traitement de décontamination a été étudié dans le chapitre III partie III présenté précédemment. La culture de la luzerne sur ces sols a pu mettre en évidence une augmentation de la part des bactéries dégradantes pour le sol traité par désorption thermique.

Bullock et Gregory (1991) ont montré que les sols urbains et sols industriels contiennent peu d'organismes, que ceux-ci ont des biomasses faibles et également que la diversité bactérienne est limitée. La contamination et les modifications des structures du sol seraient à l'origine de la réduction des qualités biologiques des sols ayant subi un fort impact anthropique. Ash (1991) observe également que ces sols sont pauvres en nutriments accessibles pour les végétaux, ce qui contribuerait à un environnement peu favorable au

développement des microorganismes et des plantes. Le sol traité par désorption thermique ne semble pas se recoloniser naturellement (voir ci-dessus). Cependant, lorsque la luzerne y est plantée, ce sol est capable de restaurer une microflore bactérienne cultivable et dégradant les HAP et de permettre la croissance des plantes (chapitre III partie III). Des observations similaires ont été faites en laboratoire au cours d'expériences réalisées sur du sable ou du sol contaminé en HAP : la présence de plantes augmente la quantité de bactéries totales et dégradant les HAP dénombrée en microplaques (Binet *et al.*, 2000b ; Corgié *et al.*, 2006).

## CONCLUSION

Les principaux résultats de cette analyse de la structure des communautés bactériennes et de la quantification des bactéries indiquent que :

- Le sol traité par désorption thermique *in situ* prélevé au cours du temps contient :
  - (i) une faible quantité de bactéries, qui évolue peu au cours du temps,
  - (ii) une diversité bactérienne limitée et constituée principalement de bactéries Gram –, proches du genre *Thiobacillus*,
  - (iii) une faible part du nombre de gènes de NDO (bactéries dégradant les HAP) par rapport au nombre de gènes 16S (l'ensemble des bactéries),
  - (iv) une dynamique des communautés fonctionnelles Gram + et Gram – qui évolue au cours du temps, suggérant un effet saisonnier qui évolue au cours du temps, avec au bout de dix mois environ davantage de bactéries dégradantes Gram + que de Gram –.
- Le sol avant et après traitement par désorption thermique des parcelles lysimétriques *in situ* à  $t_0$  contient :
  - (i) un nombre de copies de gènes 16S et de NDO hétérogène entre les différentes répétitions,
  - (ii) une diversité bactérienne homogène pour les répétitions d'un même sol mais variant d'un sol à l'autre,

**PARTIE III - Chapitre IV -**  
**Dynamique des communautés microbiennes dans le sol de Neuves Maisons traités par désorption thermique *in situ***

(iii) une faible part du nombre de gènes de NDO par rapport au nombre de gènes 16S dans le sol traité par désorption thermique,

(iv) davantage de bactéries dégradantes Gram –que de Gram +.

# PARTIE IV

---

## Discussion générale



De nombreuses études ont été réalisées pour comprendre les effets de la contamination des sols. Les travaux rapportés dans la littérature s'intéressent à l'impact d'une pollution organique ou d'une pollution métallique, mais peu de travaux concernent les pollutions multiples. Du reste, les études réalisées se limitent à certains paramètres (effet des plantes, influence de la microflore, influence la symbiose mycorhizienne, etc.). Le travail réalisé a porté sur l'étude de sols ayant subi des contaminations multiples et anciennes et a essayé de mettre en évidence l'influence des plantes et des microorganismes sur les sols tout en observant l'effet de ces sols sur les paramètres biologiques. L'originalité de cette étude réside également dans l'analyse des effets des traitements de remédiation (biopile et désorption thermique) sur la biologie des sols et l'utilisation des plantes et des microorganismes pour éliminer les contaminations résiduelles persistant à la suite de la décontamination. A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée pour mettre en évidence les impacts biologiques des traitements de remédiation.

## **1. EFFET DES SOLS CONTAMINES ET TRAITES (BIOPILE ET DESORPTION THERMIQUE) SUR LES PLANTES ET LES MICROORGANISMES ASSOCIES**

### **1.1. IMPACT SUR LA CROISSANCE DES PLANTES**

L'étude des sols non traités et des sols traités par biopile et par désorption thermique a permis de mettre en évidence différents effets sur la luzerne. En l'absence de fertilisation et de champignon MA, la croissance de la luzerne est différente pour les deux sols non traités.

Le sol d'Homécourt traité par désorption thermique a réduit nettement la croissance des plantes par rapport au sol non traité. Ce traitement de remédiation utilise de hautes températures pour volatiliser les contaminants. Des études de désorption thermique en laboratoire ont montré que ce traitement conduit à la pyrolyse des substances humiques et la décomposition des carbonates (Piña *et al.*, 2002). La modification du statut de la matière organique et la déstructuration du sol ainsi induites par les hautes températures pourraient expliquer les faibles biomasses obtenues. Avec le sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique la biomasse de la luzerne est aussi très faible, mais elle l'était même davantage dans le sol non traité, ce qui indique que d'autres facteurs que le traitement sont responsables de cette faible croissance.

Le traitement par biopile altère moins les capacités du sol pour la croissance de la végétation que le traitement par désorption thermique, cependant le sol après biopile a réduit la survie des plantes et la germination des graines de luzerne. Ce traitement de remédiation

qui consiste à optimiser la capacité biologique du sol à dégrader les contaminants pourrait induire une certaine toxicité due à une microflore particulière ou à la présence de métabolites secondaires dans le sol après traitement.

Ainsi les traitements de décontamination des HAP du sol le rendent moins fertile que le sol non traité. Cependant, il faut rappeler que ces sols contiennent des ETM en quantités importantes qui peuvent également freiner la croissance végétale. L'effet des contaminants étant variable selon le traitement du sol, son pH, sa structure et sa texture, il est possible que le traitement par désorption thermique ait rendu ces ETM plus disponibles. Hiller (2000) signale, par exemple, une augmentation du prélèvement des ETM par les plantes lorsque la quantité de particules fines du sol augmente.

## 1.2. INFLUENCE SUR LE CHAMPIGNON MA

Les expériences menées sur les sols contaminés et traités ont montré des effets différents sur la mycorhization et sur *Glomus intraradices*. Tout d'abord, les travaux ont montré que le sol d'Homécourt contenait un potentiel mycorhizien infectieux, ce qui n'était pas le cas dans le sol de Neuves-Maisons. Le traitement par biopile a significativement réduit le potentiel mycorhizien du sol d'Homécourt, tandis qu'après traitement par désorption thermique, dans les deux sols, il n'y avait plus de champignons mycorhiziens, même 6 mois après le traitement.

L'inoculation avec *Glomus intraradices* a permis de rétablir une colonisation mycorhizienne élevée dans le sol de Neuves-Maisons non traité et dans le sol d'Homécourt traité par biopile et par désorption thermique, ce qui indique que le potentiel mycorhizien bas dans ces sols était lié à l'absence de champignons, ou de champignons tolérants à la toxicité. Cet isolat provenant d'un sol contaminé en ETM (Hildebrandt *et al.*, 1999) pourrait ainsi tolérer la présence de métaux dans le sol de Neuves-Maisons. Pawloska et Charvat (2004) ont montré que *Glomus intraradices* est capable de résister à un stress provoqué par la présence d' ETM par une stratégie d'évitement et la recherche de microsites sans ETM. En revanche, quel que soit le sol, mais plus particulièrement avec celui de Neuves-Maisons, les traitements de remédiation ont limité la recolonisation par le champignon inoculé. Outre l'élimination incomplète des contaminants (pollution résiduelle en HAP, pollution en ETM et métalloïdes maintenue), ces traitements semblent altérer les propriétés du sol freinant ainsi la mycorhization. Cette altération pouvant être attribuée à la matière organique présente dans ces sols, la mycorhization étant dépendante de la matière organique.

### 1.3. IMPACT SUR LES BACTERIES DEGRADANTES

La présence des HAP semble influencer les communautés bactériennes des sols, d'autant que certains auteurs montrent que les sites à pollution ancienne contiennent davantage de bactéries dégradantes (Hwang et Cutright, 2002). Cependant le taux de contamination des sols en HAP ne détermine pas dans cette étude le nombre de copies de gène 16S dans les sols non traités puisque les bactéries sont plus nombreuses dans le sol non traité de Neuves-Maisons. Les communautés dégradantes dominantes varient également d'un sol non traité à l'autre : le sol d'Homécourt a une communauté bactérienne dégradante à dominance Gram + tandis que celle de Neuves-Maisons est à dominance Gram -.

Les dénombrements de bactéries cultivables et la quantification des gènes ont montré que les traitements de remédiation réduisent la quantité de bactéries totales et dégradantes et orientent également la structure des communautés. Après traitement par biopile, le pourcentage de bactéries dégradantes cultivables est du même ordre de grandeur que dans le sol non traité, tandis que le rapport NDO/16S augmente, mais comme dans le sol non traité les bactéries portant le gène de la NDO sont principalement des Gram +. Bien que la concentration des HAP soit faible dans les sols traités par désorption thermique et que la quantité des bactéries dégradantes soit plus faible que dans les sols non traités, il faut souligner que le pourcentage de bactéries dégradantes cultivables et le rapport NDO/16S dans le sol d'Homécourt traité sont plus élevés que dans le sol non traité. Ceci indique une recolonisation forte par ces bactéries, qui pourrait être lié à la présence de concentrations résiduelles en HAP et au stockage de ces sols traités sur un site encore en partie contaminé. Cependant, ce sont cette fois des bactéries Gram - possédant le gène NDO qui recolonisent le sol d'Homécourt après désorption thermique. Pour le sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique, le rapport NDO/16S est en revanche plus faible que dans le sol non traité. Les prélèvements sur le terrain au cours du temps montrent que le nombre et la diversité globale des bactéries évolue peu. La part de bactéries dégradantes n'évolue pas davantage.

Les analyses réalisées au laboratoire montrent une diversité bactérienne limitée dans les sols traités par désorption thermique. Il apparaît que la mise en place de la culture, l'apport de fertilisation et l'introduction d'un champignon MA permet de restaurer une microflore bactérienne et fongique dans ces sols. L'effet positif des cultures réalisées est d'autant plus important si on les compare à l'évolution du sol en conditions naturelles. En effet, l'étude *in situ* du sol de Neuves-Maisons traité par désorption thermique montre que la diversité bactérienne évolue peu au cours du temps. Les successions écologiques bactériennes et

végétales sont assez mal connues notamment lorsque le milieu a subi une pollution. Le couvert végétal est fonction de la géologie, de l'écologie, des saisons et des modifications anthropiques (Lincoln *et al.*, 1998). La composition de la végétation dans des sites pollués dépend de la tolérance des espèces, des associations symbiotiques comme la mycorhization (Van der Putten *et al.*, 2000 ; Wiegleb et Felinks, 2001) qui va augmenter la richesse spécifique en espèces végétales (Allen, 1991 ; Francis et Read, 1994) et avantager les successions végétales (Regvar *et al.*, 2006). Du reste, la restauration d'un couvert végétal est primordial pour les sols contaminés car, en plus d'améliorer les qualités microbiologiques du sol, la végétation joue un rôle protecteur dans la dispersion par le vent des fines particules de sol contaminé et réduit les transferts de la pollution à la phase liquide du sol (Tordoff *et al.*, 2000).

## **2. EFFET DES PLANTES ET DES MICROORGANISMES ASSOCIES SUR LE DEVENIR DES POLLUANTS DANS LES SOLS CONTAMINES ET TRAITES (BIOPILE ET DESORPTION THERMIQUE)**

Les résultats expérimentaux ont montré que la présence de luzerne semblait réduire la dissipation des HAP dans les sols étudiés. Ce résultat semble contradictoire avec d'autres études réalisées antérieurement sur des systèmes similaires. Cette différence d'effet sur la dégradation des HAP dans la rhizosphère peut être attribuée au fait que les différentes expériences de la littérature sont souvent menées sur des sols artificiellement contaminés en HAP. Le présent travail a utilisé des sols présentant une contamination âgée puisque les sols utilisés sont issus de sites industriels qui ont débuté leurs activités en 1874 pour le site de Neuves-Maisons et en 1922 pour le site d'Homécourt.

L'absence de dégradation des HAP durant les cultures de la luzerne peut être attribuée à l'âge de la pollution qui limite la biodisponibilité des HAP (Huesemann *et al.*, 2004). En effet, la minéralisation des HAP décroît en fonction du temps de résidence des polluants (Erickson *et al.*, 1993 ; Hatzinger et Alexander, 1995). Avec le temps, les HAP interagissent avec la MO du sol (par différents phénomènes comme la partition, l'adsorption, l'absorption, la diffusion, la formation de liaisons covalentes...). Ils migrent ainsi vers les micropores du sol (2-360 nm) (Alexander, 1995) et sont incorporés dans la phase solide du sol (Ehlers et Luthy, 2003) où ils deviennent inaccessibles aux microorganismes (Hatzinger et Alexander, 1995 ; Willumsen et Karlson, 1997).

Néanmoins, l'âge de la pollution ne suffit pas à expliquer les résultats obtenus. En effet, Binet *et al.* (2000b) montrent une dégradation des HAP sur un sol à pollution artificielle

âgée, même si celle-ci est réduite. De la même façon, Joner et Leyval (2003b) observent une dégradation des HAP sur des sols d'anciennes cokeries, après des cultures de trèfle et de ray grass de 13 et 26 semaines. Cependant, il faut souligner que les expériences réalisées dans ce travail ont duré 8 et 4 semaines seulement, les expériences en vase de végétation ayant été limitées par la survie des plantes, ce qui a pu être trop court pour observer un effet significatif de la plante sur la dissipation des HAP.

La luzerne, utilisée dans différentes expériences sur des sols contaminés en HAP (Nichols *et al.*, 1997 ; Reilley *et al.*, 1996) est considérée comme une plante ayant un bon potentiel de phytoremédiation. La symbiose de cette légumineuse avec des bactéries de type rhizobium lui confère un avantage supplémentaire par rapport à d'autres plantes utilisées en phytoremédiation (e.g. ray grass) (Shann et Boyle, 1994). Les communautés bactériennes de la rhizosphère qui utilisent les exsudats racinaires sont souvent déterminées par une espèce de plante. La réduction de la dégradation des HAP en présence de la luzerne peut être due à l'utilisation préférentielle des exsudats racinaires par les bactéries plutôt que l'utilisation de composés plus complexes comme les HAP. Ainsi, l'utilisation d'une autre plante au cours de ces expériences aurait pu faire varier la structure des communautés bactériennes par la production d'exsudats racinaires différents et ainsi optimiser la dégradation bactérienne des HAP. De plus, la structure du système racinaire de la luzerne (en pivot) lui permet de prospecter le sol en profondeur et ainsi de permettre la dégradation des HAP jusqu'à 1,2-1,8 m (EPA, 1998). Le choix d'une autre plante de structure racinaire différente pourrait modifier le volume du sol rhizosphérique et conditionner d'une autre façon la microflore bactérienne dégradante.

Chaîneau *et al.* (2005) ainsi que Baker (1994) montrent que l'apport de nutriments améliore la biodégradation en comblant les carences en P et en N engendrées par la contamination en HAP. L'apport de fertilisation au cours des expériences réalisées ici n'a pas permis d'améliorer les capacités de biodégradation des microorganismes. Le choix du niveau de fertilisation a été déterminé par l'analyse agronomique des sols étudiés. Cependant cette analyse ne reflète pas la disponibilité des éléments pour les plantes, notamment pour les sols traités. La présence de pollution multiple ainsi que les modifications apportées par les traitements de remédiation nécessitent peut être une fertilisation plus riche en certains éléments ou adaptée à chacun des sols. La fertilisation apportée au cours des expériences menées en vase de végétation a pu être mal adaptée aux différents sols étudiés mais également mal adaptée pour la plante utilisée. Même si cet apport de nutriments était insuffisant ou mal adapté pour permettre la stimulation de la biodégradation, il apparaît que la fertilisation

associée à la mycorhization a permis d'améliorer la croissance de la luzerne. Ainsi une optimisation de l'apport de nutriments pour de futures cultures sur des sols à pollution multiple pourrait peut être permettre d'améliorer la dégradation des HAP par les bactéries.

Les multiples interactions entre polluants ne sont pas bien connues. Les interactions entre les différents ETM, ou entre polluants organiques et polluants métalliques, comme par exemple Zn avec le phénanthrène et le benzo[a]pyrène peuvent être antagonistes ou synergiques (Shen *et al.*, 2005, Saison *et al.*, 2004), mais varient également selon les teneurs des éléments. Cette complexité de réaction entre les différents polluants des sols à pollution multiple a pu également réduire l'efficacité de l'association plante-microorganisme selon la sensibilité des espèces aux polluants. De plus, les propriétés hydrophobes des HAP ont pu également limiter l'effet bénéfique de l'association plante-microorganismes basée sur des flux de substances solubles.

Contrairement à certains travaux où le polluant organique sont des HAP légers comme l'anthracène, le phénanthrène ou le pyrène (Corgié *et al.*, 2006a, Leyval et Binet, 1998 ; Binet *et al.*, 2001 ; Schwab et Banks, 1994 ; Reilley *et al.*, 1996) les sols utilisés ici présentent une gamme de HAP plus variée, plus lourds et nécessitant un temps de dégradation plus long. Dans un tel contexte, les bactéries dégradantes devraient mettre en œuvre un processus de cométabolisme afin de dégrader les HAP les plus lourds (partie I synthèse bibliographique), qui est accéléré en présence d'exsudats racinaires (Joner *et al.*, 2002). Cependant, la présence d'exsudats racinaires pourrait aussi limiter la biodégradation des HAP en fournissant des sources de carbone plus facilement dégradables par les microorganismes. Ainsi en utilisant des dispositifs simplifiés avec des exsudats et le phénanthrène comme seules sources de carbone, Corgié *et al.* (2004) montrent que la dissipation du phénanthrène peut être inférieure en présence de la plante à une certaine distance de la racine.

Joner et Leyval (2003b) et Corgié *et al.* (2004, 2006b) ont mis en évidence un gradient de dégradation des HAP en fonction de la distance aux racines, dégradation qui serait optimale de 3 à 6 mm et minimale de 0,3 à 0,6 mm dans leurs conditions expérimentales. Cette variation serait attribuée à une réduction de la quantité de nutriments de 0,3 à 0,6 mm des racines (Corgié *et al.*, 2004, 2006b ; Joner et Leyval 2003a). Dans l'expérience avec la luzerne sur le sol d'Homécourt non traité et traité par biopile, un effet de la distance aux racines a été également mis en évidence : en effet, les concentrations en HAP étaient supérieures dans le compartiment rhizosphérique par rapport au non rhizosphérique, sauf lorsque la plante était inoculée et fertilisée. Toutefois, dans cette expérience, la distinction

entre les différentes zones du sol rhizosphérique n'a pas été effectuée comme dans les travaux mentionnés ci-dessus. Il semble cependant que l'effet de la rhizosphère sur la biodégradation des HAP soit lié à des phénomènes complexes qui méritent encore d'être précisés.

La disponibilité des contaminants est un facteur majeur qui affecte la biodégradation (Providenti *et al.*, 1993). La biodisponibilité des HAP peut être modifiée à différents niveaux par la présence de plantes (exsudats racinaires, croissance des racines, agrégats du sol, statut de la matière organique, structure du contaminant associé à la MO) et dépendre de paramètres liés à la présence de certains microorganismes (surfactants, hyphes des champignons MA) (Alexander, 2000). Les expériences réalisées ici n'ont pas pris en compte la disponibilité des HAP ne permettant pas de connaître l'effet des plantes et du champignon MA sur la quantité de HAP biodégradable. Cependant, la concentration plus élevée de HAP dans le sol rhizosphérique que dans le sol non rhizosphérique de la luzerne suggère plutôt une biodisponibilité plus faible des HAP dans la rhizosphère. Corgié (2004) a montré l'effet de la rhizosphère vis-à-vis des HAP et des communautés microbiennes qui évolue spatialement et temporellement. Ainsi, la poursuite de ces expériences sur différents temps et en s'intéressant davantage aux compartiments rhizosphériques et non rhizosphériques permettrait de préciser l'effet de la plante sur la biodisponibilité et la dissipation des HAP.

L'effet bénéfique de *Glomus intraradices* sur la survie et la croissance des plantes dans les sols contaminés a été confirmée au cours de ce travail pour l'ensemble des sols à l'exception du sol non traité d'Homécourt, qui contenait déjà des champignons indigènes et celui de Neuves-Maisons traité par désorption thermique qui a inhibé la mycorhization. Cet effet sur la biomasse a été plus important lors de l'apport de nutriments. Du reste, la nodulation a été d'autant plus importante que la mycorhization était élevée, ce qui indique un effet marqué de la mycorhization sur la nodulation, qui n'a, à notre connaissance, jamais été souligné dans les sols contaminés. La différence de biomasse observée entre les différentes modalités et les différents sols pourrait ainsi être attribuée à l'effet concomitant du champignon MA et du *rhizobium*.

L'association mycorhizienne semble être un facteur clef permettant la culture de plantes sur les sols contaminés ou traités. Ainsi, on observe une relation nette entre la biomasse des plantes et la fréquence de colonisation des racines ( $r^2 = 0,72$ , données non présentées).

La présence de *Glomus intraradices* semble avoir contribué à l'augmentation de la quantité de bactéries dénombrées en microplaques (sol de Neuves-Maisons) et à la modification des communautés bactériennes (sol d'Homécourt), ce qui a pu être observé également par Mansfeld-Giese *et al.* (2002) avec *Glomus intraradices* et Corgié *et al.*, (2006) avec *Glomus mosseae*. La symbiose mycorhizienne contribuant à la modification du sol rhizosphérique semble ainsi exercer une pression de sélection pour les bactéries. En présence de champignon, les transferts d'éléments nutritifs du sol vers la plante sont favorisés conduisant à une modification de l'exsudation racinaire. D'après les dénombrements des bactéries cultivables, le nombre de bactéries dégradantes n'augmente pas sous l'influence de la mycorhization, alors que l'une des hypothèses avancées sur le rôle de la mycorhization vis-à-vis de la dégradation dans la rhizosphère serait une stimulation de la dégradation microbienne (Joner *et al.*, 2001, Joner et Leyval, 2003b). Cependant, ce résultat ne concerne que les bactéries cultivables, la quantification des gènes de dégradation n'ayant pas pu être effectuée dans cette expérience, et des analyses complémentaires mériteraient d'être effectuées.

L'inoculation par *Glomus intraradices* a modifié également la diversité bactérienne et fongique totale et mycorhizienne du sol rhizosphérique. Il a réduit la diversité mycorhizienne lorsque le sol contenait des champignons MA (sol d'Homécourt non traité et traité par biopile) ou l'a augmentée, lorsque le sol n'en contenait pas (sol traité par désorption thermique). La diversité des communautés fongiques totales a été, quant à elle, augmentée par l'inoculation de *Glomus intraradices*. Ces résultats suggèrent que l'introduction d'un champignon MA conduit à une pression de sélection au sein de la microflore fongique en réduisant la diversité des sols biologiquement plus actifs (sol non traité et sol traité par biopile) et en augmentant la diversité dans le sol le plus pauvre biologiquement (traité par désorption thermique).

Contrairement aux résultats publiés dans la littérature (Joner et Leyval, 2003b), dans ces expériences, malgré ces effets significatifs sur la croissance de la plante, l'inoculation par *G.intraradices* n'a pas eu d'effet sur la dissipation des HAP dans la rhizosphère. Cette absence d'effet pourrait être liée à l'absence d'effet plante, à la durée de l'expérience, à la faible disponibilité des HAP, mais aussi dans le sol d'Homécourt à la présence de champignons indigènes, et dans le sol de Neuves-Maisons à une faible colonisation par le champignon. Cependant, il faut souligner que la modalité inoculée et fertilisée pour le sol d'Homécourt est la seule où la concentration en HAP dans le sol non rhizosphérique est

supérieure à celle du sol rhizosphérique, suggérant un effet de l'inoculation sur le sol non rhizosphérique et donc l'extension de la rhizosphère.

La présence du champignon mycorhizien a toutefois limité l'absorption d'ETM et de l'arsenic par la luzerne pour le sol de Neuves-Maisons non traité, où la contamination métallique est la plus importante, ce qui confirme les résultats publiés dans la littérature sur des sols pollués par des ETM, mais n'avait pas été montré dans des sols à pollution multiple.

### **3. LIMITES DE L'ETUDE ET APPROCHES COMPLEMENTAIRES**

#### **3.1. LIMITES DE L'ETUDE**

##### **■ Mise en place des expériences**

Les expériences menées au laboratoire peuvent conduire à des modifications des sols étudiés. Le stockage à 4°C des sols prélevés avant les expériences, même s'il freine l'activité biologique ne l'inhibe pas complètement (Rost *et al.*, 2002) et constitue une phase d'incubation. La mise en place des cultures contribue à l'hétérogénéité du système avec le mélange du sol, ce qui peut conduire à la rupture des agrégats, à l'introduction d'air, etc. Ainsi, le statut de la matière organique peut être modifié par remobilisation ou séquestration de certains nutriments. Ce « priming effect » observé par certains auteurs (Joner *et al.*, 2004 ; Kuzyakov *et al.*, 2000) peut masquer les effets des différents traitements des expériences de laboratoire (Joner *et al.*, 2004).

Les résultats obtenus ici sont issus de cultures menées avec un seul type de plante (la luzerne) et de champignon MA (*Glomus intraradices*). L'utilisation d'autres espèces végétales, légumineuse ou non, herbacée ou indigène au site contaminé aurait peut être conduit à des résultats différents en raison d'une exsudation, d'une survie et d'un comportement vis-à-vis des nutriments différents. De la même façon l'inoculation avec un autre champignon MA, plus adapté à la multicontamination, ou présent naturellement dans le sol aurait peut être conduit à d'autres conclusions. L'association plante-*rhizobium*-champignon MA est un facteur clef du présent travail. Le choix de ces acteurs pourrait être optimisé afin de permettre une meilleure survie ou une meilleure biodégradation des polluants et d'identifier ainsi plus précisément les processus.

Le temps de culture limité des différentes expériences réalisées a pu être un frein à la mise en place de processus de biodégradation. La mise en place de cultures successives de la luzerne sur des sols contaminés en ETM a montré une optimisation de la remédiation du sol (Canarutto *et al.*, 1993). Ainsi, un temps de culture plus long ou plusieurs cultures pourraient amplifier les mécanismes de biodégradation.

### ■ Techniques d'analyse de la microflore des sols

Différentes méthodes ont été utilisées pour étudier et quantifier les microflores totales et dégradantes, comme les dénombrements des microorganismes cultivables, la TTGE et la PCR en temps réel. Chaque méthode a ses spécificités et ses limites et il n'a pas été possible d'utiliser chacune d'elle dans toutes les expériences afin de les comparer. Les dénombrements en microplaques ne concernent que les bactéries dégradantes cultivables. Cependant, la mesure des bactéries dégradantes est un bon indicateur du niveau d'exposition de l'environnement aux HAP (Braddock *et al.*, 1995) et leur quantité informe sur leur potentiel de biodégradation des HAP (Kämfer *et al.*, 1993). Cependant, l'augmentation des bactéries dégradantes n'est pas corrélée à l'activité enzymatique de celles-ci (Chaineau *et al.*, 1999).

La PCR en temps réel et la TTGE ont été effectuées à partir d'extraction d'ADN, et ne se limitent donc pas à la microflore cultivable. Les analyses de TTGE ont permis d'étudier la microflore bactérienne et fongique globale. Cependant, les modifications intervenant lors de la bioremédiation ne portent pas forcément sur la quantité de bactéries mais davantage sur les fonctions de celles-ci (Siciliano *et al.*, 2003). C'est pourquoi la PCR en temps réel qui permet de quantifier des gènes fonctionnels sélectionnés, a finalement été utilisée. Ainsi, les bactéries dégradantes analysées dans les différentes expériences ne sont pas comparables directement. Cependant, les tendances observées avec les différentes méthodes vont dans le même sens. L'utilisation de l'ensemble de ces techniques pour une expérience aurait pu permettre d'avoir une meilleure approche de la quantité et de la diversité des bactéries dégradantes contenues dans ces sols. La présence des gènes ne reflétant pas leur expression, l'utilisation de l'ARN pourrait être un atout essentiel dans la compréhension de la dégradation bactérienne des HAP dans les sols étudiés.

La technique utilisée pour étudier les champignons mycorhiziens, basée sur la TTGE à partir d'une amorce spécifique aux champignons mycorhiziens (amorce AM1, Helgason *et al.*, 1998) et d'une amorce universelle des eucaryotes (NS31, Simon *et al.*, 1992), n'a pas permis de vérifier la présence de l'isolat de *Glomus intraradices* inoculé dans les expériences, ni de prendre en compte la diversité intraspécifique de ces champignons. L'utilisation d'autres techniques, comme celle basée sur l'ADNr 25S développée par Van Tuinen *et al.* (1998) permettrait de compléter les informations obtenues et d'aborder la diversité intraspécifique.

### 3.2. APPROCHES COMPLEMENTAIRES DE L'ETUDE

La biodisponibilité des polluants est un des facteurs essentiels intervenant sur leur biodégradation. Notre étude s'est limitée à l'analyse des HAP totaux présents dans le sol. La mesure de la quantité de HAP biodisponibles aurait pu mettre en évidence des changements en présence de la luzerne, et expliquer pourquoi la plante limite la biodégradation des HAP. De nombreuses méthodes d'extraction ont été proposées pour accéder au compartiment biodisponible des HAP en utilisant le méthanol (MacLeod et Semple, 2000), l'éthanol (Kelsey et Alexander, 1997), le butanol-1 (Kelsey *et al.*, 1997), des résines (Parrish *et al.*, 2005) ou encore des cyclodextrines (Reid *et al.* 2000). Cependant, la notion de HAP biodisponible reste mal définie, comme l'atteste le nombre de techniques d'extraction utilisées dans la littérature, et leur interprétation reste sujet à controverse. L'approche de la biodisponibilité des contaminants est un point cependant essentiel qui mériterait d'être approfondi dans des expériences ultérieures afin de définir également les valeurs limites en deçà desquelles la biodégradation n'est plus possible.

L'analyse de sols multicontaminés traités ou non montre une réelle complexité du système liée à différentes interactions. Les expériences réalisées ici se sont basées sur l'étude de sols provenant de deux sites industriels uniquement. L'utilisation d'autres sols pourrait apporter des informations pertinentes. En effet, si l'âge de la contamination est un paramètre important dans la biodisponibilité des HAP, la comparaison de la culture de plante et des communautés bactériennes sur des sols à pollution plus ou moins ancienne pourrait permettre de préciser les mécanismes mis en jeu.

L'étude des métabolites secondaires, indices d'une dégradation effective pourrai permettre d'approfondir la compréhension des processus de dégradation en jeu dans ces expériences, tant au niveau de la voie métabolique utilisée (influence de la bactérie et/ou de la plante) qu'au niveau de l'évolution de la toxicité des polluants au cours du temps (métabolites secondaires plus ou moins toxiques que la molécule initiale).

L'étude des métabolites secondaires (terpène, isoprène, coumarines...) des plantes pourrait également apporter des informations sur la dynamique bactérienne de dégradation des HAP. En effet, la production de ces molécules, qui ont souvent des analogies de structure avec les contaminants du sol, permet de limiter le stress occasionné par la pollution. Le salicylate permet aux plantes de résister davantage à la présence de contaminants (Chen et

Aitken 1999). Du reste, Singer *et al.* (2003) mettent en évidence que des sources exogènes de salicylate permettent d'augmenter la survie des bactéries dégradant les HAP et qu'elles induiraient les gènes bactériens de dégradation des HAP. Les connaissances approfondies de ces métabolites secondaires permettraient ainsi de déterminer les plantes sécrétant les métabolites secondaires les plus propices à la dégradation des HAP par voie bactérienne.

L'activité enzymatique du sol est modifiée par la présence de polluants et est corrélée à l'activité des bactéries dégradant les HAP. En effet, le niveau d'activité de la deshydrogènase, la catalase et l'uréase indique la biodégradation puisque il a été démontré que l'activité de ces enzymes augmente durant la biodégradation (Frankenberger et Johanson, 1982). Du reste, la présence à la fois d' ETM et de HAP interagit sur l'activité enzymatique. En effet, l'activité de l'uréase, considérée comme l'enzyme la plus sensible à la dissipation des HAP (Bååth, 1989), serait augmentée en présence de Zn et de phénanthrène tandis qu'elle serait réduite en présence de Zn et de benzo[a]pyrène (Shen *et al.*, 2005, Saison *et al.*, 2004) car le métal peut intervenir sur la disponibilité de l'hydrocarbure. Des connaissances plus poussées sur l'activité enzymatique du sol permettraient ainsi de préciser les différentes interactions entre les ETM et les HAP qui peuvent favoriser ou inhiber la biodégradation des HAP dans les sols multipollués.

L'étude des communautés bactériennes d'un point de vue fonctionnel semble être le principal point à approfondir dans de futures expériences afin de connaître la structure des communautés effectivement actives et leur part dans la population totale. Afin de mieux comprendre la dynamique de la biodégradation des HAP dans les sols contaminés, une connaissance plus poussée du métabolisme bactérien pourrait être envisagée. L'analyse des profils lipidiques des bactéries (phospholipid fatty acid, PLFA) pourrait mettre en évidence les organismes viables (MacNaughton *et al.*, 1999). L'utilisation de marqueurs stables ( $^{13}\text{C}$ ) ou marqués ( $^{14}\text{C}$ , Johnsen et Karlson, 2005 ; Johnsen *et al.*, 2002) pourrait également être envisagée afin de suivre les variations métaboliques ayant lieu durant la biodégradation. Du reste, d'autres approches moléculaires permettraient de mettre en évidence les communautés bactériennes actives et leurs fonctions comme par exemple l'utilisation des ARNm en PCR temps réel (Morgan *et al.*, 2002 ; Popp *et al.*, 2006) ou la séparation de l'ADN par sonde isotopique (Separation by Isotope Probing, SIP).

# Conclusion générale



## CONCLUSION GENERALE

A notre connaissance peu ou pas d'études ont été réalisées sur des sols contaminés ayant subi des traitements de décontamination (e.g. biopile, désorption thermique) et leur potentialité d'utilisation future autre que comme remblais. Le présent travail repose donc sur des expériences originales, qui étudient des sols à contamination multiple avant et après leurs traitements. L'étude menée ici montre que, malgré les traitements de remédiation, les pollutions résiduelles demeurant après la décontamination, et les modifications des propriétés physicochimiques ou biologiques associées au traitement, ne permettent pas la restauration des propriétés des sols notamment de leurs qualités biologiques, espérée en réduisant la teneur en polluants.

Les expériences réalisées ici, en vase de végétation, ont ainsi permis de mettre en évidence un effet des sols sur les plantes et sur les communautés microbiennes, avec dans certains cas une réduction de croissance de la plante, et une plus grande toxicité dans le sol traité par rapport au sol contaminé. L'inoculation d'un champignon MA a montré un réel effet positif pour la culture de la luzerne. La symbiose mycorhizienne a, en effet, augmenté la survie et la croissance de la luzerne mais a permis également d'améliorer l'absorption du phosphore. Si la dissipation des HAP dans la rhizosphère n'a pas été stimulée et a même été limitée, en revanche, l'inoculation par le champignon a permis de limiter l'absorption d'ETM par la plante. La mise en culture des sols avec la luzerne, et la symbiose mycorhizienne ont permis aussi de modifier, voire de restaurer les communautés bactériennes dans les sols traités, ce qui n'est pas le cas lorsque le sol est laissé nu *in situ*.

Le présent travail a permis de mettre en évidence également la difficile extrapolation des résultats obtenus d'un sol contaminé à un autre. Malgré de nombreuses études menées sur les sols contaminés, l'interaction entre les différents polluants n'est pas encore élucidée complètement et varie selon les sols. Du reste, il apparaît que les traitements de remédiation des sols, en réduisant la pollution en HAP, ont en revanche un impact sur les propriétés biologiques des sols en altérant notamment les capacités de croissance des plantes et la diversité des communautés microbiennes.

Malgré la complexité des systèmes étudiés (nature et âge de la pollution, interactions entre les populations microbiennes indigènes), qui semblent difficilement généralisables, ces résultats montrent l'aspect fondamental de l'étude des relations sols-plantes-microorganismes, en particulier l'importance de la mycorhization, pour la remédiation et la restauration des propriétés de ces sols contaminés et des sols traités et la nécessité de préciser les mécanismes et les paramètres qui les contrôlent.



---

# Annexes



## ANNEXE 1

**Teneurs en éléments majeurs dans les parties aériennes et les racines de la luzerne à l'issue de culture sur le sol traité et les sols traités d'Homécourt pour l'ensemble des échantillons et chacune des modalités**

en mg.g <sup>-1</sup>	Fe parties		Mg parties		Ca parties		K parties	
	aériennes	racinaires	aériennes	racinaires	aériennes	racinaires	aériennes	racinaires
Sol non traité	NI/NF	0,84 ± 0,10	1,39 ± 0,03	10,65 ± 0,17	3,49 ± 0,08	18,03 ± 0,99	9,92 ± 0,72	
	NI/F	3,07 ± 0,95	1,17 ± 0,07	10,24 ± 0,39	5,95 ± 0,99	22,57 ± 1,36	12,96 ± 0,58	
	I/NF	1,40 ± 0,44	1,32 ± 0,16	10,74 ± 0,56	4,48 ± 0,60	20,37 ± 0,60	10,59 ± 2,22	
ANOVA	I/F	1,73 ± 0,15	1,56 ± 0,16	9,91 ± 0,33	5,86 ± 0,41	25,15 ± 1,09	16,91 ± 1,91	
	I	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
	F	n.s.	*	n.s.	**	**	n.s.	
Sol traité	IxF	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
	NI/NF	0,31 ± 0,14	2,29 ± 0,94	2,48 ± 0,34	4,62 ± 1,26	7,66 ± 1,79	10,40 ± 4,95	22,15 ± 3,23
	NI/F	0,15 ± 0,01	1,51 ± 0,29	3,12 ± 0,32	2,62 ± 0,50	8,27 ± 0,59	5,24 ± 0,80	22,88 ± 0,91
ANOVA	I/NF	0,13 ± 0,02	1,04 ± 0,14	2,94 ± 0,43	1,91 ± 0,12	8,09 ± 0,77	11,75 ± 7,37	22,14 ± 1,85
	I/F	0,16 ± 0,02	1,38 ± 0,32	2,95 ± 0,05	2,13 ± 0,17	7,84 ± 0,08	4,92 ± 0,52	24,44 ± 0,53
	I	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.
ANOVA	F	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	IxF	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	NI/NF	0,16 ± 0,01	2,94 ± 1,29	2,14 ± 0,16	5,25 ± 1,31	14,50 ± 0,71	13,71 ± 3,68	20,50 ± 2,37
ANOVA	NI/F	0,14 ± 0,02	2,08 ± 0,46	2,27 ± 0,26	4,66 ± 1,01	13,34 ± 0,24	10,66 ± 1,30	22,71 ± 0,51
	I/NF	0,29 ± 0,12	1,12 ± 0,18	2,58 ± 0,22	3,24 ± 0,27	14,69 ± 0,48	6,33 ± 0,68	28,89 ± 1,31
	I/F	0,14 ± 0,02	1,77 ± 0,78	1,91 ± 0,19	2,63 ± 0,74	11,61 ± 0,89	9,91 ± 3,95	75,68 ± 52,34
ANOVA	I	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	F	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	IxF	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
ANOVA	S	n.s.	n.s.	***	*	*	*	*
	Sol non traité	a	a	a	a	a	a	a
	Sol traité	a	a	b	b	b	b	a
ANOVA	désorption thermique	a	a	c	c	c	c	a
	désorption thermique	a	a	c	c	c	c	a
	désorption thermique	a	a	c	c	c	c	a

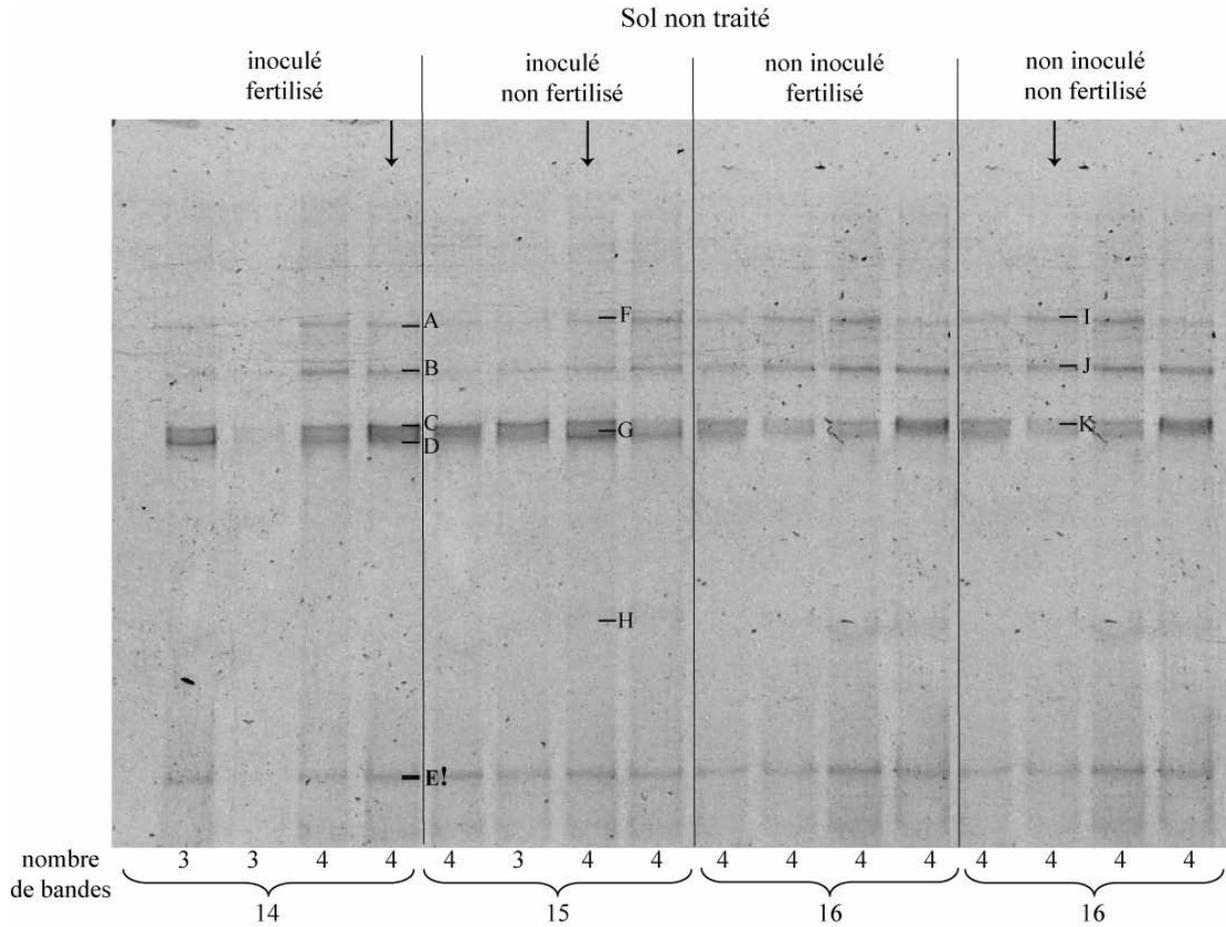
**Tableau A1: Teneurs en éléments majeurs (Fe, Mg, Ca et K) dans les parties aériennes et les racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt non traité, traité par biopile et traité par désorption thermique.**

Les erreurs standard sont données pour n=4. Pour l'ensemble des sols, les analyses statistiques sont réalisées sur le paramètre sol (S) par ANOVA à trois niveaux. Deux lettres différentes indiquent des différences significatives, avec \* : p≤0,05, \*\* : p≤0,01, \*\*\* : p≤0,001 et n.s. : effet non significatif.



## ANNEXE 2

**Analyse moléculaire de la mycorhization à l'issue de culture de luzerne sur le sol traité et les sols traités d'Homécourt pour l'ensemble des échantillons et chacune des modalités**

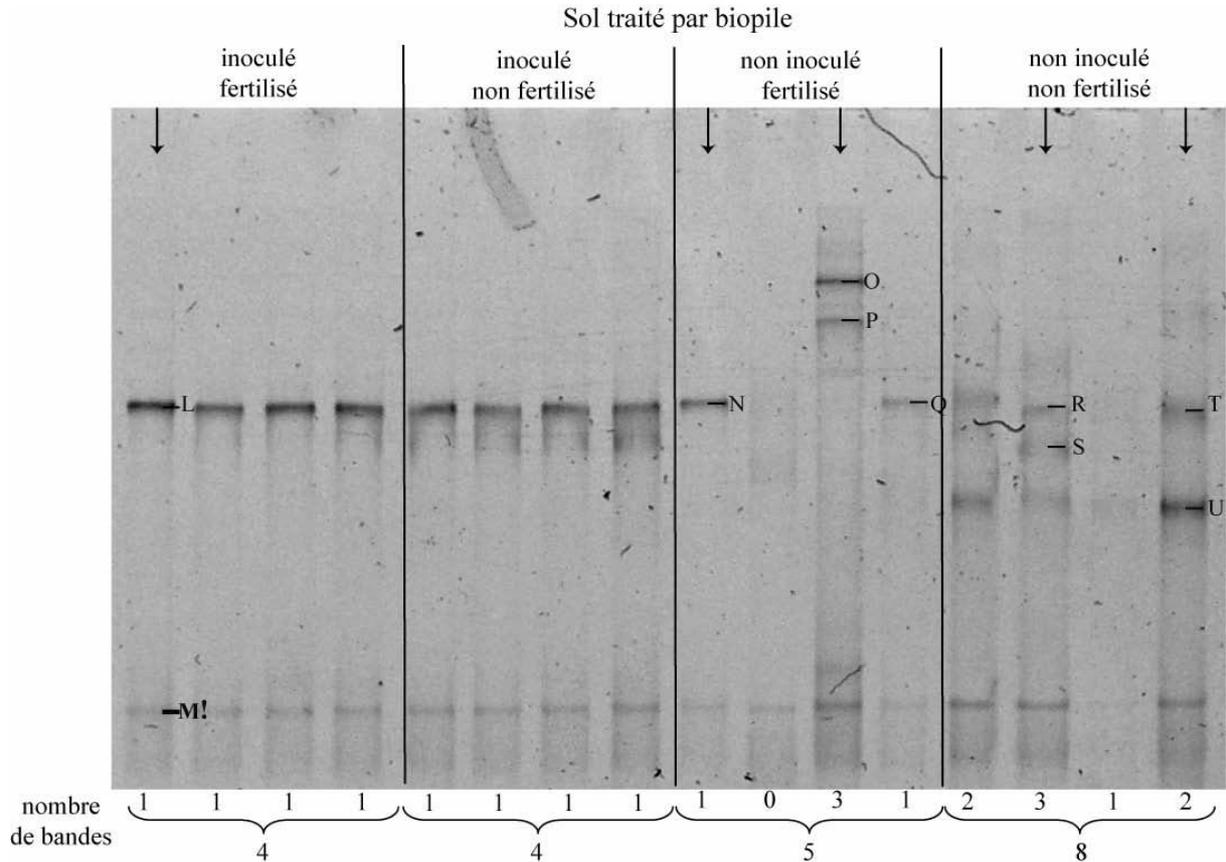


**Figure A2.1.: Gel de TTGE montrant les différents profils obtenus par les techniques de PCR-TTGE sur l'ADN 18S dans les racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt non traité.**

Les échantillons analysés sont indiqués par des flèches et les bandes séquencées sont indiquées par des traits et des lettres différentes.

## ANNEXE 2

**Analyse moléculaire de la mycorhization à l'issue de culture de luzerne sur le sol traité et les sols traités d'Homécourt pour l'ensemble des échantillons et chacune des modalités**

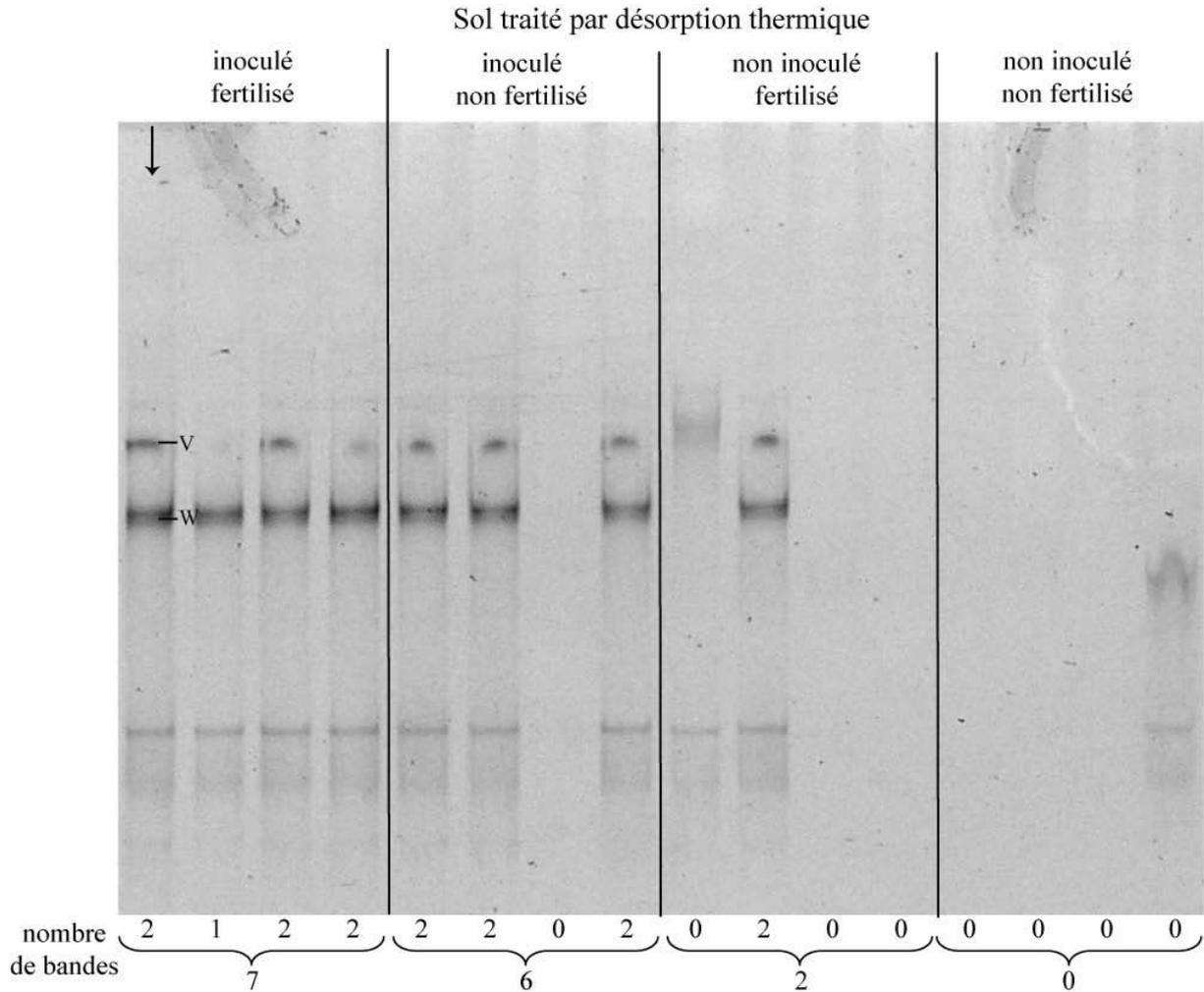


**Figure A2.2.** Gel de TTGE montrant les différents profils obtenus par les techniques de PCR-TTGE sur l'ADN 18S dans les racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt traité par biopile.

Les échantillons analysés sont indiqués par des flèches et les bandes séquencées sont indiquées par des traits et des lettres différentes.

## ANNEXE 2

**Analyse moléculaire de la mycorhization à l'issue de culture de luzerne sur le sol traité et les sols traités d'Homécourt pour l'ensemble des échantillons et chacune des modalités**



**Figure A2.3: Gel de TTGE montrant les différents profils obtenus par les techniques de PCR-TTGE sur l'ADN 18S dans les racines de la luzerne après 56 jours de culture sur le sol d'Homécourt traité par désorption thermique.**

Les échantillons analysés sont indiqués par des flèches et les bandes séquencées sont indiquées par des traits et des lettres différentes.



# Références bibliographiques



..-A-

- Adriano D. C., 1986. Trace Elements in the Terrestrial Environment. Springer, New York, USA. 533 p.
- Alexander M., 1977. Introduction to soil microbiology, John Wiley and Sons eds. Inc. New York. 472 p.
- Alexander M., 1995. How toxic are toxic chemical in soil? Environmental Science and Technology, 29, 2713-2717.
- Alexander M., 2000. Aging, bioavailability and overestimation of risk from environmental pollutants. Environmental Science and Technology, 34, 4259-4265.
- Allen M. F., 1991. The ecology of mycorrhizae. Cambridge University Press, Cambridge. 196p.
- Alloway J. B., 1990. Heavy metals in soils. Blackie and Son eds, Glasgow. 339 p.
- Amellal N., Portal J-M. and Berthelin J., 2001. Effect of soil structure on bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil. Applied Geochemistry, 16, 1611-1619.
- Ames R. N., Reid C. P. P. and Ingham E. R., 1984. Rhizosphere bacterial population responses to root colonization by a vesicular-arbuscular-mycorrhizal fungus. New Phytologist, 96, 555-563.
- Amora-Lazcano E., Vázquez M. M. and Azcon R., 1998. Response of nitrogen-transforming microorganisms to arbuscular mycorrhizal fungi. Biology and Fertility of Soils, 27, 65-70.
- Anderson T. A., Gurthie E. A. and Walton B. T., 1993. Bioremediation. Environmental Science and Technology, 27, 260-263.
- Andrade G., Mihara K. L., Linderman R. G. and Bethlenfalvay G. J., 1997. Bacteria from the rhizosphere and hydrosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. Plant and Soil, 192, 71-79.
- Andrade G., Mihara K. L., Linderman R. G. and Bethlenfalvay G. J., 1998. Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. Plant and Soil, 202, 89-96.
- Aprill W. and Sims R. C., 1990. Evaluation of the use of prairies grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. Chemosphere, 20, 253-265.
- Arfsten D. P., Schaeffer D. J. and Mulveny D. C., 1996. The effects of near ultraviolet radiation on the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in animals and plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety, 33, 1-24.

- Arzayus K. M., Dickhut R. M. and Canel E. A., 2001. Fate and atmospherically deposited polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Chesapeake bay. *Environmental Science and Technology*, 35, 2178-2183.
- Ash H. J., 1991. Soils and vegetation in urban areas. In *Soils in the Urban Environment*, Bullock, P. and Gregory, P. eds. Blackwell, Oxford UK. 174 p
- Augé R. M., Kubikova E. and Moore J. L., 2001. Foliar dehydration tolerance of mycorrhizal cowpea, soybean and bush bean. *New Phytologist*, 151, 535-541.
- Aust S. D. 1990. Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbial Ecology*, 20, 197-209.
- Aziza-Chulan H. and Martin K., 1992. The vesicular-arbuscular (VA) mycorrhiza and its effects on growth of vegetatively propagated *Theobroma cacao* L. *Plant and Soil*, 144, 227- 233.

**-B-**

- Bååth E., 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water, Air, and Soil Pollution*, 47, 335-379.
- Back S. O., Field R. A. and Goldstone M. E., 1991. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: sources fate and behaviour. *Water, Air and Soil Pollutions*, 60, 279-300.
- Baker K. H. and Herson D.S., 1994. Bioremediation of surface and subsurface soils. In *Bioremediation*, Baker K. H. and Herson D.S. eds. 375 p. McGraw-Hill, NY.
- Balandreau J. and Knowles R., 1978. The rhizosphere. In *Interactions between non-pathogenic soil microorganismes and plants*. Dommergues Y. R. and Krupa S. V. eds. Elsevier, Amsterdam. 475 p.
- Ballerini D., Gatellier C. and Vogel T. T., 1998. Techniques de traitement par voie biologique des sols pollués. ADEME ed..246 p.
- Barea J. M., Azcon R. and Azcon-Aguilar C., 1983. Interactions between phosphate solubilizing bacteria and VA mycorrhiza to improve plant utilization of rock phosphate in non-acidic soils. *IMPHOS Proceedings of the 3rd International Congress on Phosphorus Compounds*, Brussels, 1983. pp 127-144.
- Barea J. M., Azcon R. and Azcon-Aguilar C., 2005a. Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In *Microorganisms in soils: Roles in genesis and functions*. Buscot F. and Varma S. eds. Springer. 422 p.

- Barea J. M. and Jeffries P., 1995. Arbuscular mycorrhizae in sustainable soil-plant systems. In *Mycorrhiza*, Varma A. and Hock B. eds; Springer-verlag, Berlin. 704 p.
- Barea J. M., Werner D., Azcon-Aguilar C. and Azcon R., 2005. Interactions of arbuscular mycorrhiza and nitrogen fixing symbiosis in sustainable agriculture. In *Agriculture, forestry ecology and the environment*. Werner D. and Nexton W.E. eds. Kluwer Academic Publishers. 374 p.
- Barns S. M., Fundyga R. E., Jeffries M. W. and Pace N. R., 1994. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 1609-1613.
- Baudoin E., Benizri E. and Guckert A., 2001. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 35, 1183-1192.
- Baudoin E., Benizri E. and Guckert A., 2002. Metabolic fingerprinting of microbial communities from distinct maize rhizosphere compartments. *European Journal of Soil Biology*, 37, 85-93.
- Baumard P., Budzinski H. and Garrigues P., 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the western Mediterranean Sea. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 765-776.
- Bazin M.J., 1990. In Lynch J. M., 1990. *The rhizosphere*. John Wiley and Sons Inc, Chichester. 458 p.
- Berthelin J., Leyval C. and Toutain F., 1994. Biologie des sols - rôle des organismes dans l'altération et l'humification. In *Pédologie, Constituants et propriétés des sols*. Deuxième édition. Bonneau M. and Souchier B. eds. Masson, Paris. 665 p.
- Biache C., 2006. Biodegradation et oxydation thermique de la matière organique de terres issues de friches industrielles et incidences sur la mobilité des éléments traces métalliques. Rapport de MASTER Géosciences et Génie Civil, Connaissance et Gestion des Sols et des Eaux, Université Henri Poincaré, Nancy. 40 p.
- Biache C., Mansuy-Huault L., Faure P., Munier-Lamy C. and Leyval C., 200x. Effets of thermal and biological remediations on the composition of two coking plant soils: impact on solvent extractable organic compounds and metal bioavailability. *Science of Total Environment*. Submitted.
- Bidar G., 2002. La TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis): Un outil moléculaire appliqué à l'étude de la diversité fongique dans un sol pollué. Rapport de Diplôme d'Etude Approfondies en Sciences Agronomiques, INPL-ENSAIA, Nancy.

- Binet P., Portal J-M. and Leyval C., 2000a. Dissipation of 3-6 ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 2011-2017.
- Binet P., Portal J-M. and Leyval C., 2000b. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. *Plant and Soil*, 227, 207-213.
- Binet P., Portal J-M. and Leyval C., 2001. Application of GC-MS to the study of anthracene disappearance in the rhizosphere of ryegrass. *Organic Geochemistry*, 32, 217-222.
- Bodelier P. L. E., Wijlhuizen A. G., Blom C. W. P. M. and Laanbroek H. J., 1997 Effects of photoperiod on growth of and denitrification by *Pseudomonas chlororaphis* in the root zone of *Glyceria maxima* studied in a genotobiotic microcosm. *Plant and Soil*, 190, 91-103.
- Bogan B. W., Schoenike B., Lamar R. T. and Cullen D., 1996. Expression lip genes during growth in soil and oxidation of anthracene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology*, 62, 3697-3703.
- Borneman J., Skroch P. W., O'Sullivan K. M., Palus J. A., Rumjanek N. G., Jansen J. L., Nienhuis J. and Triplett E. W., 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied Environmental Microbiology*, 62, 1935-1943.
- Bonneau M. and Souchier B., 1994. *Pédologie, Constituants et propriétés des sols*. Deuxième édition. Bonneau M. and Souchier B. eds. Masson, Paris.665 p.
- Bouwer E. J. and Zehnder A. J. B., 1993. Bioremediation of organic compound-putting microbial metabolism to work. *Trends in Biotechnology*, 11, 360-367.
- Bowen G. D. and Rovira A. D., 1991. The rhizosphere, the hidden half of the hidden half. In *Plant Roots, the hidden half*, Eds Y Waisel, A Eshel and U Kafkafi. pp 641-629. Marcel Dekker, New York.
- Boyle D., Wiesner C. and A. R., 1998. Factor affecting the degradation of polyaromatic hydrocarbons in soil by white rot fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 873-882.
- Boyle M. and Paul E. A., 1988. Vesicular-arbuscular mycorrhizal associations with barley on sewage-amended plots. *Soil Biology and Biochemistry*, 20, 945-948.
- Braddock J. F., Lindstrom J. E. and Brown E. J., 1995. Distribution of hydrocarbon-degrading microorganisms in sediments from Prince William Sound, Alaska, following the Exxon valdez oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, 30, 125-132.
- Brookes P. C. and McGrath S. P., 1984. Effects of metal toxicity and the size of the soil microbial biomasse. *Journal of Soil Science*, 35, 341-346.

- Budi S. W., Van Tuinen D., Martinotti G. and Gianinazzi S., 1999. Isolation from *Sorghum bisolor* mycorrhizosphere of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soil-borne fungal pathogens. *Applied and Environment Microbiology*, 65, 5148-5150.
- Bullock P. and Gregory P., 1991. *Soils in the urban Environment*. Blackwell, Oxford. 174 p.
- Burken J. G., Shanks J. V. and Thompson P. L., 2000. Phytoremediation and plant metabolism of explosives and nitroaromatic compounds. In *Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives*. Spain J.C., Hugues J.B., Knackmuss H.J. eds. Lewis, Washington. 434 p.

-C-

- Cabello M. N., 1997. Hydrocarbon pollution: its effect on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *FEMS Microbiology Ecology*, 22, 233-236.
- Caetano-Anolles G., Crist-Estes D. K. and Bauer W. D., 1988. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *Journal of Bacteriology*, 170, 3164-3169.
- Canarutto S., 1993. Decontamination of an heavy metal-contaminated soil by the growth of *Medicago sativa* L.: laboratory trials. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2, 711-716.
- Carpenter-Boggs L., Lyoynachan T. E. and Stahl P. D., 1995. Spore germination of *Gigaspora margarita* stimulated by volatiles of soil-isolated actinomycetes. *Soil Biology and Biochemistry*, 27, 1445-1451.
- Carroll K. M., Harkness M. R., Bracco A. A. and Balcarcel R. R., 1994. Application of a permeant/polymer diffusional model to the desorption of polychlorinated biphenyls from Hudson river sediments. *Environmental Science and Technology*, 28, 253-258.
- Cavaliere E. L., Rogan E. G., Roth R. W., Saugier R. K. and Hakam A., 1983. The relationship between ionization potential and horseradish peroxidase/hydrogen peroxide-catalyzed binding of aromatic hydrocarbons to DANN. *Chemico-biological Interaction*, 47, 87-109.
- Cébron A., Norini M-P., Beguiristain T. and Leyval C., 2007. Phytoremediation of PAH-contaminated soil influences the global bacterial population and favoured PAH-degraders. *Communication orale, Rhizosphere, 2<sup>d</sup> conférence internationale, Montpellier, 2007*.
- Cébron A., Norini M-P., Beguiristain T. and Leyval C., 2008. Real time PCR quantification of Gram positive and Gram negative PAH degrading bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods, In Press*.

- Cerniglia C. E., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3, 351-368.
- Cerniglia C. E., 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19, 324-333.
- Cerniglia C. E., Gibson D. T. and Dodge R. H., 1994. Metabolism of benzo[a]anthracene by filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *Applied Environmental Microbiology*, 60, 3931-3938.
- Chaîneau C. H., Morel J-L. and Oudot J., 1996. Land treatment of oil-based drill cuttings in an agricultural soil. *Journal of Environmental Quality*, 4, 858-867.
- Chaîneau C. H., Morel J-L. and Oudot J., 1997. Phytotoxicity and plant uptakes of fuel oil hydrocarbons. *Journal of Environmental Quality*, 26, 1478-1483.
- Chaîneau C. H., Morel J-L., Dupont J., Bury E. and Oudot J., 1999. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *The Science of the Total Environment*, 227, 237-247.
- Chaîneau C. H., Rougeux G., Yéprémian C. and Oudot J., 2005. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 1490-1497.
- Chang T. C. and Yen J. H., 2006. On-site mercury-contaminated soils remediation by using thermal desorption technology. *Journal of Hazardous Materials*, 128, 208-217.
- Chaudri A. M., Allain C. M. G., Barbosa-Jefferson V. L., Nicholson F. A., Chambers B. J. and McGrath S. P., 2000. A study of the impacts of Zn and Cu on two rhizobial species in soils of a long-term experiment. *Plant and Soil*, 221, 167-179.
- Chaudri A. M., McGrath S. P., Giller K. E. and Mench M., 1993. Enumeration of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soils previously treated with metal-contaminated sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, 301-309.
- Chen B. D. and Aitken G. R., 1999. Salicylate stimulate the degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. *Environmental Science and Technology*, 33, 435-439.
- Chen B. D., Christie P. and Li X. L., 2001. A modified glass bead compartment cultivation system for studies on nutrient and trace metal uptake by arbuscular mycorrhiza. *Chemosphere*, 42, 185-192.

- Chen B. D., Li X. L., Tao H. Q., Christie P. and Wong M. H., 2003. The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soli spiked with various quantities of zinc. *Chemosphere*, 50, 839-846.
- Choi B. K., Paster B. J., Dewhirst F. E. and Gobel U. B., 1994. Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis. *Infection and Immunity*, 62, 1889-1895.
- Clark F. E., 1949. Soil microorganisms and plant roots. *Advances in Agronomy*, 1, 241-288.
- Colin C., 2000. Pollution localisée des sols et des sous-sols par les hydrocarbures et par les solvants chlorés. Rapport de l'Académie des Sciences n°44, Technique et Documentation, Lavoisier, Paris. 417 p.
- Corgié S. C., 2004. Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques, sélection et dynamique des populations bactériennes dans la rhizosphère en fonction de la distance aux racines. Thèse de doctorat en Sciences de l'Univers, Université Henri Poincaré, Nancy. 190 p.
- Corgié S. C., Beguiristain T. and Leyval C., 2004. Spatial distribution of bacterial communities and phenantrene (PHE) degradation in the rhizosphere of *Lolium perenne* L. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3552-3557.
- Corgié S. C., Beguiristain T. and Leyval C., 2006. Differential composition of bacterial communities as influenced by phenantrene and dibenzo[a,h]anthracene in the rhizosphere of ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Biodegradation*, 17, 511-521.
- Corgié S. C., Fons F., Beguiristain T. and Leyval C., 2006. Biodegradation of phenantrene, spatial distribution of bacterial populations on dioxygenase expression in the mycorrhizosphere of *Lolium perenne* inoculated with *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza*, 16, 207-212.
- Corgié S. C., Joner E. J. and Leyval C., 2003. Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots. *Plant and Soil*, 257, 143-150.
- Cornejo P., Azcon-Aguilar C., Barea M. J. and Ferrol N., 2004. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 241, 265-270.
- Costes J. M. and Druelle V., 1997. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement: la rehabilitation des anciens sites industriels. *Revue de l'Institut Francais du Petrole*, 52, 425-440.

- Crepineau C., Rychen G., Feidt C., Le Roux Y., Lichtfouse E. and Laurent F., 2003. Contamination of pastures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the vicinity of a highway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4841-4845.
- Criquet S., Joner E. J., Leglize P. and Leyval C., 2000. Anthracene and mycorrhiza affect the activity of oxidoreductases in the roots and the rhizosphere of lucerne (*Medicago sativa* L.). *Biotechnology Letters*, 22, 1733-1737.
- Cunningham S. D., Anderson T. A., Schwab A. P. and Hsu F. C., 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organics pollutants. *Advances in Agronomy*, 56, 55-144.
- Curl E. A. and Truelove B., 1986. *The rhizosphere*, Springer Verlag, Heidelberg, Berlin. 288p.

**-D-**

- Daane L. L., Harjono I., Zylstra G. J. and Häggblom M. M., 2001. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Applied and Environment Microbiology*, 67, 2683-2691.
- Dabestani R. and Ivanov I., 1999. A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Photochemistry and Photobiology*, 70, 10-34.
- Dalton H. and Stirling D. I., 1982. Co-metabolism. *Phil Trans Roy soc Lond B* 297, 481-496.
- Daniels B. A. and Trappe J. M., 1980. Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus epigaeus*. *Mycologia*, 72, 457-471.
- Darmendrail D., 2000. In Colin C., 2000. Pollution localisée des sols et des sous-sols par les hydrocarbures et par les solvants chlorés. Rapport de l'Académie des Sciences n°44, Technique et Documentation, Lavoisier, Paris. 417 p.
- Darrah P. R., 1991. Models of the rhizosphere. I. Microbial population dynamics around a root releasing soluble and insoluble carbon. *Plant and Soil*, 133, 187-199.
- Davies S. H. R. and Evans W. C., 1964. Oxidative metabolism of phenantrene and anthracene by soil pseudomonads. The ring fission mechanism. *Biochemistry Journal*, 91, 251-261.
- Davis E. A. and Young J. L., 1985. Endomycorrhizal colonization of glass-house grown wheat as influenced by fertilizer salts when banded or soil-mixed. *Canadian Journal of Botany*, 63, 119-1203.
- Davis L. C., Banks M. L., Schwab A. P., Muralidharan N., Erikson L. E. and Tracy J. C., 1996. Plant based bioremediation. In *Bioremediation*, Ed S I., Basel.

- De Gregori I., Fuentes E., Rojas M., Pinochet H. and Potin-Gauthier M., 2003. Monitoring of copper, arsenic, and antimony levels in agricultural soils impacted and non-impacted by mining activities, from three regions in Chile. *Journal of Environmental Monitoring*, 5, 287-295.
- Dean-Ross D. and Cerniglia C. E., 1996. Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46, 307-312.
- Dehne H. W., 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *The American Phytopathological Society*, 78, 1115-1119.
- Del Val C., Barea J.M. and Azcon-Aguilar C., 1999. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungus populations in heavy metal contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 718-723.
- Deneux-Mustin S., Lartiges S. B., Villemin G., Thomas F., Yvon J., Bersillon J. L. and Snidaro D., 2001. Ferric chloride and lime conditioning of activated sludges: an electron microscopic study on resin embedded samples. *Water research*, 35, 3018-3024.
- Dommergues Y. R. and Krupa S. V., 1978 Interactions between non-pathogenic soil microorganismes and plants. Dommergues Y. R. and Krupa S. V. eds. Elsevier, Amsterdam. 475 p.
- Donnelly P. K., Hegde R. S. and Fletcher J. S., 1994. Growth of PCB-degrading bacteria on compounds from photosynthetic plants. *Chemosphere*, 28, 981-988.
- Dutta T. K. and Harayama S., 2000. Fate of crude oil by the combination of photooxidation and biodegradation. *Environmental Science and Technology*, 34, 1500-1505.
- Dyrborg S., 1996. Microbial degradation of water-soluble creosote compounds. In: *Environmental and Engineering*. pp 73. Technical university of Denmark.

**-E-**

- Edwards N. T., 1983. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) in the terrestrial environment-a review. *Journal of Environmental Quality*, 12, 427-441.
- Edwards N. T., 1988. Assimilation and metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons by vegetation - an approach to this controversial issue and suggestions for future research. In: *10 Th Int. Symp*, 1988. Ed M C a A J Dennis. pp 211-229.
- Ehlers L. J. and Luthy R. G., 2003. Contaminant bioavailability in soil and sediment: improving risk assessment and remediation rests on better understanding bioavailability. *Environmental Science and Technology*, 37, 295-302.

- Eissenstat D. M., Graham J. H., Syvertsen J. P. and Drouillard D. L., 1993. Carbon economy of sour orange in relation to mycorrhizal colonization and phosphorus status. *Annals of Botany*, 71, 1-10.
- El Kherbawy M., Angle J. S., Heggo A. and Chaney R. L., 1989. Soil pH, rhizobia and vesicular-arbuscular mycorrhizae inoculation effects on growth and heavy metal uptake of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 8, 61-65.
- Erickson D. C., Loehr R. C. and Neuhauser E. F., 1993. PAH loss during bioremediation of manufactured gas plant site soils. *Water Resources*, 27, 911-919.
- Erickson M., Dalhammar G. and Borg-Karlson A. K., 2000. Biological degradation of selected hydrocarbons in an old PAH/creosote contaminated soil from a gas work site. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 619-626.

**-F-**

- Felske A., Akkermans A. D. L. and De Vos W. M., 1998. Quantification of 16S rRNA in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4581-4587.
- Ferro A., Kennedy J., Doucette W., Nelson S., Jauregui G., McFarland B. and Bugbee B., 1997. Fate of benzene in soils planted with alfalfa: Uptake, volatilization, and degradation. In *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*, Ed T A A E.L. Kruger, and J.R. Coats. American Chemical Society, Washington.
- Ferro A., Kennedy J., Doucette W., Nelson S., Jauregui G., McFarland B. and Bugbee B., 1997. Fate of benzene in soils planted with alfalfa: Uptake, volatilization, and degradation. In *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*, Ed T A A E.L. Kruger, and J.R. Coats. American Chemical Society, Washington.
- Ferro A. M., Kennedy J. and Knight D., 1997. Greenhouse-scale evaluation of phytoremediation for soils contaminated with wood preservatives. In *Fourth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium*, New Orleans, 1997. pp 309-314.
- Feselstein J., 1989. PHYLIP: Phylogeny Inference Package (version 3.2). *Cladistics*, 5, 164-166.
- Field J. A., DeJong E., Costa G. F. and DeBont J. A. M., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2219-2226.

- Filion M., Hamelin R. C., Bernier L. and St Arnaud M., 2004. Molecular profiling of rhizosphere microbial communities associated with healthy and diseased black spruce (*Picea mariana*) seedlings grown in a nursery. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3541-3551.
- Fismes J., Perrin-Ganier C., Empereur-Bissonnet P. and Morel J-L., 2002. Soil-to-root translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons by vegetables grown on industrial contaminated soils. *Journal of Environmental Quality*, 31, 1649-1656.
- Fitter A. H., 1991. Costs and benefits of mycorrhizae: Implications for hinctionning under natural conditions. *Expenentia*, 47, 350-355.
- Fliessbach A., Martens R. and Reber H. H., 1994. Soil microbial biomass and microbial activity in soils contaminated with heavy metal contaminated sewage sludge applications. *Soil Biology and Biochemistry*, 26, 1201-1205.
- Foster R. C., 1986. The ultrastructure of the rhizoplan and rhizosphere. *Annual Review of Phytopathology*, 24, 211-233.
- Francis R. and Read D. J., 1994. The contributions of mycorrhizal fungi to the determination of plant community structure. *Plant and Soil*, 159, 11-25.
- Frankenberger W. T. and Johansson J. B., 1982. Influence of crude oil on refined petroleum products on soil deshydrogenase activity. *Journal of Environmental Quality*, 11, 602-607.
- Fredrickson J. K., Balkwill D. L., Drake G. R., Romine M. F., Ringelberg D. B. and White D. C., 1995. Aromatic degrading *Sphingomonas* isolate from the deep surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1917-1922.
- Freeman W. M., Walker S. J. and Vrana K. E., 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques*, 26, 112-125.
- Fu G., Kan A. T. and Tomson M., 1994. Adsorption and desorption hysteresis of PAHs in surface sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13, 1559-1567.

**-G-**

- Gadd G. M., 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, 124, 25-60.
- Gadd G. M., 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, 122, 109-119.
- Gao Y., Ling W. and Wong M. H., 2006. Plant-accelerated dissipation of phenantrene and pyrene from water in the presence of a nonionic-surfactant. *Chemosphere*, 63, 1560-1567.
- Gao Y. and Zhu L. Z., 2004. Plant uptake, accumulation and translocation of phenantrene and pyrene in soils. *Chemosphere*, 55, 1169-1178.

- Garbisu C. and Alkorta I., 2001. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology*, 77, 229-236.
- Garon D., Krivobok S. and Seigle-Murandi F., 2000. Fungal degradation of fluorene. *Chemosphere*, 40, 91-97.
- Germida J. J., Siciliano S. D., Renato de Freitas J. and Seib A. M., 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, 26, 43-50.
- Gianinazzi-Pearson V., Branzanti B. and Gianinazzi S., 1989. In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis*, 7, 243-256.
- Gibson D. T., Mahadevan V., Jerina D. M., Yagi H. and Yeh H. J. C., 1975. Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and benzo[a]anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science*, 189, 295-297.
- Gibson D. T., Resnick S. M., Lee K., Brand J. M., Torok D. S., Wackett L. P., Schoken M. J. and Haigler B. E., 1995. Desaturation, dioxygenation and monooxygenation reactions catalyzed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain 9816-4. *Journal of Bacteriology*, 177, 2615-2621.
- Gibson D. T. and Parales R. E., 2000. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 236-243.
- Gildon A. and Tinker P. B., 1983. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal infections and heavy metals in plants. The effects of heavy metals on the development of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *New Phytologist*, 95, 247-261.
- Giller K. E., Beare M. H., Lavelle P., Izac A-M. N. and Swift M. J., 1997. Agricultural intensification, soil diversity and agroecosystem function. *Applied Soil Ecology*, 6, 3-16.
- Giller K. E., Witter E. and McGrath S. P., 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 1389-1414.
- Ginzinger D. E., 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30, 503-512.
- Glatt H., Wameling C., Elsberg S., Thomas H., Marquardt H., Hewer A., Phillips D., Oesch F. and Seidel A., 1993. Genotoxicity characteristics of reverse diol - epoxides of chrysene. *Carcinogenesis*, 14, 11-19.

- Gobat J-M., Aragno M. and Matthey W., 1998. Le sol vivant. Bases de pédologie, biologie des sols. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Collection Gérer l'Environnement n°14, Lausanne. 569 p
- Gohre V. and Paszkowski U., 2006. Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta*, 223, 1115-1122.
- Grady C. P. L., 1985. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. *Biotechnology Bioengineering*, 27, 660-674.
- Gram T. E., 1995 Metabolic activation and toxicity of some chemical agents to lung tissue and cells. *Biochemical Pharmacology*, 49, 1721-1727.
- Gramss G. and Rudeschko O., 1998. Activities of oxidoreductase enzymes in tissue extracts and sterile root exudates of three crop plants and some properties of the peroxidase component. *New Phytologist*, 138, 401-409.
- Gramss G., Voigt K. D. and Firsche B., 1999a. Oxidoreductase enzymes liberated by plant roots and their effects on soil humic material. *Chemosphere*, 38, 1481-1494.
- Gramss G., Voigt K. D. and Kirsche B., 1999b. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatics rings by higher fungi in sterile and unsterile soils. *Biodegradation*, 10, 51-62.
- Gramss G., Ziegenhagen D. and Sorge S., 1999c. Degradation of soil humic extract by wood and soil-associated fungi, bacteria and commercial enzymes. *Microbial Ecology*, 37, 140-151.
- Grayston S. J., Wang S., Campbell C. D. and Edwards A. C., 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 369-378.
- Greenberg A., Darack F., Harkov R., Liroy P. and Daisey J., 1985. Polycyclic aromatic hydrocarbons in New Jersey: a comparison of winter and summer concentrations over a 2-year period. *Atmospheric Environment*, 19, 1325-1339.
- Guerin W. F. and Boyd S. A., 1995. Maintenance and induction of naphthalene degradation activity in *Pseudomonas putida* and an *Alcaligenes* sp. under different culture conditions. *Applied and Environment Microbiology*, 61, 4061-4068.
- Günther T., Dornberger U. and Fritsche W., 1996. Effects of ryegrass on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere*, 33, 203-215.

**-H-**

- Habe H. and Omori T., 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 67, 225-243.
- Haeseler F., Stieber M., Werner P. and Frimmel H. F., 1993. Ecotoxicological aspects of chemical pre-oxidation combined with subsequent microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Contaminated Soil'93 Proceedings of the Fourth International FZK/TNO conference on contaminated soil*, Arendt F., Annokkee G.J. Bosman R. and Van den Brink W.J eds, Springer. 1685 p.
- Haeseler F., Blanchet D., Druelle V., Werner P. and Vandecasteele J.P., 1998. Degradation of PAH: pollutant accessibility and efficiency of soil microflorae. *Contaminated Soil'98 Proceedings of the Sixth International FZK/TNO conference on contaminated soil*, Volume 2, Thomas Telford publisher. 1298 p.
- Halsall C. J., Barrie L. A., Fellin P., Muir D. C. G., Billeck B. N., Lockhart L., Rovinsky F. Y., Kononov E. Y. and Pastukhov B., 1997. Spatial and temporal variation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the arctic atmosphere. *Environmental Science and Technology*, 31, 3593-3599.
- Hammel K. E., 1992. Oxidation of aromatic pollutants by lignin-degrading fungi and their extracellular peroxidases. *Metal Ions in Biological System*, 28, 41-60.
- Harayama S., 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Current Opinion in Biotechnology*, 8, 268-273.
- Hartmann R., 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in forest soils: critical evaluation of a new analytical procedure. *Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 62, 161-173.
- Hatzinger P. B. and Alexander M., 1995. Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environmental Science and Technology*, 29, 537-545.
- Hedges and Messens 1990. In *The rhizosphere*. Lynch J. M., 1990. John Wiley and Sons Inc, Chichester. 458 p.
- Heggo A., Angle J. S. and Chaney R. L., 1990. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. *Soil Biology and Biochemistry*, 22, 865-869.
- Heitkamp M. A. and Cerniglia C. E., 1988. Mineralisation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below and oil field. *Applied Environmental Microbiology*, 54, 1612-1614.
- Heitzer A. and Sayler G. S., 1993. Monitoring the efficacy of bioremediation. *Trends in Biotechnology Technology*, 11, 334-351.

- Helgason T., Daniell T., Husband R., Fitter A. H. and Young J. P. W., 1998. Ploughing up the wood-wide web? *Nature*, 394, 431-434.
- Henner P., Schiavon M., Morel J-L. and Lichtfousse E., 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) occurrence and remediation methods. *Analysis*, 25, 56-59.
- Herbes S. E., 1977. Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons between dissolved and particulates phases in natural waters. *Water Ressources*, 11, 493-600.
- Heuer H., Hartung K., Wieland G., Kramer I. and Smalla K., 1999. Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S-RNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. *Applied and Environment Microbiology*, 65, 1045-1049.
- Hewitt E.J., 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. In: Technical communication. 547 p. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, London.
- Hildebrandt U., Karldorf M. and Bothe H., 1999. The zinc violet and its colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Physiology*, 154, 718-728.
- Hill A. J. and Goshal S., 2002. Micellar solubilization of naphthalene and phenanthrene from nonaqueous-phase liquids. *Environment Science and Technology*, 36, 3901-3907.
- Hill C. J., Walsh K. A., Harris J. A. and Moffett B. F., 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol*, 43, 1-11.
- Hiller D. A., 2000. Properties of urbic anthrosols from an abandoned shunting yard in the Rhur area, Germany. *Catena*, 39, 245-266.
- Hiltner L., 1904. Über neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiet der bodenbakteriologie unter besonderer berücksichtigung der gründung und brache (on recent insights and problems in the area of soil bacteriology under special consideration of the use of green manure and fallowing). *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft*, 98, 59-78.
- Hirsch A., 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist*, 122, 211-237.
- Ho Y., Jackson M., Yang Y., Mueller J. G. and Pritchard P. H., 2000. Characterization of fluoranthene- and pyrene-degrading bacteria isolated from PAH contaminated soils and sediments. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24, 100-112.
- Hoffland E., Findenegg G. R. and Nelemans J. A., 1989. Solubilization of rock phosphates by rape. I. Evaluation of the role of the nutrient uptake pattern. *Plant and Soil*, 113, 155-160.

- Höflich G., Wiehe W. and Kühn G., 1994. Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. *Experientia*, 50, 897-905.
- Hsu F. C. and Bartha R., 1979. Accelerated mineralization of two organophosphate insecticides in the rhizosphere. *Applied Environmental Microbiology*, 37, 36-41.
- Huang W., Peng P., Yu Z. and Fu J., 2003. Effect of organic matter heterogeneity on sorption and desorption of organic contaminants by soils and sediments. *Applied Geochemistry*, 18, 955-972.
- Huang X. D., Dixon D. G. and Greenberg A., 1993. Impacts of UV radiation and photomodification on the toxicity of PAHs to the higher plant *Lemna gibba* (Duckweed). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 1067-1077.
- Huesemann M. H., Hausmann T. S. and Fortman T. J., 2004. Does bioavailability limit biodegradation? A comparison of hydrocarbon biodegradation and desorption rates in aged soils. *Biodegradation*, 15, 261-274.
- Hugues B. and Plantat J. L., 1983. Calculation of the most probable number and its confidence limit when the number of inoculum per dilution is considerable. *Chemosphere*, 12, 1679-1684.
- Hurst C. J., Sims R. C., Sims J. L., Sorensen D. L., Mclean J. E. and Huming S., 1996. Polycyclic aromatic biodegradation as a function of oxygen tension in contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 51, 193-208.
- Hwang S. and Cutright T. J., 2002. Biodegradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. *Chemosphere*, 47, 891-899.
- Hwang S., Ramirez N., Cutright T. J. and Ju L. K., 2003. The role of soil properties in pyrene sorption and desorption. *Water, Air and Soil Pollution*, 143, 65-80.

**-J-**

- Jeannée N., 2001. Caractérisation géostatistique de pollutions industrielles de sols - Cas des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur d'anciens sites de cokeries. These de doctorat en Géostatistique, Ecole des Mines de Paris. 201 p.
- Jensen E. S. and Folker-Hansen P., 1995. Soil quality criteria for selected organic compounds. Danish Environmental Protection Agency.
- Johansson J. F., Paul L. R. and Finlay R. D., 2004 Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology*, 48, 1-13.

- Johnsen A. R., Winding A., Karlson U. and Roslev P., 2002. Linking microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of  $^{13}\text{C}$ -labeled cell lipids. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 6106-6113.
- Johnsen A. R. and Karlson U., 2005. PAH Degradation Capacity of Soil Microbial Communities - Does it depend on PAH exposure? *Microbial Ecology*, 50, 488-495.
- Johnsen A. R., Wick L. Y. and Harms H., 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133, 71-84.
- Johnson A. C., Larsen P. F., Gadbois D. F. and Humason A. W., 1985. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the surficial sediments of Penobscot Bay (Maine, USA) in relation to possible sources and to other sites worldwide. *Marine Environmental Research*, 15, 1-16.
- Johnson D. L., Leake J. R., Ostle N., Ineson P. and Read D. J., 2002. In situ  $(\text{CO}_2)$ - $^{13}\text{C}$  pulse labelling of upland grassland demonstrates a rapid pathway of carbon flux from arbuscular mycorrhizal mycelia to the soil. *New Phytologist*, 153, 327-334.
- Joner E. J. and Leyval C., 1997. Uptake of  $^{109}\text{Cd}$  by roots and hyphae of a *Glomus mossae/Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil amended with high and low concentrations of cadmium. *New Phytologist*, 135, 253-260.
- Joner E. J., Briones R. and Leyval C., 2000. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. *Plant and Soil*, 226, 227-234.
- Joner E. J., Johansen A., Loibner A. P., De La Cruz M.A., Szolar O. H. J., Portal J-M. and Leyval C., 2001. Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil. *Environmental Science and Technology*, 35, 2773-2777.
- Joner E. J. and Leyval C., 2001a. Time-course of heavy metal uptake in maize and clover as affected by root density and different mycorrhizal inoculation regimes. *Biology and Fertility of Soils*, 33, 351-357.
- Joner E. J. and Leyval C., 2001b. Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza*, 10, 155-159.
- Joner E. J., Corgié S. C., Amellal N. and Leyval C., 2002. Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 859-864.
- Joner E. J. and Leyval C. 2003a. Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants: a new aspect of rhizospher interactions. *Agronomie*, 23, 495-505.

- Joner E. J. and Leyval C., 2003b. Rhizosphere gradient of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environmental Science and Technology*, 37, 2371-2375.
- Joner E. J., Hirmann D., Szolar O. H. J., Todorovic D., Leyval C. and Loibner A. P., 2004. Priming effects on PAH degradation and ecotoxicity during a phytoremediation experiment. *Environmental Pollution*, 128, 429-435.
- Jones D., 1998. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant and Soil*, 204, 24-44.
- Jones K. C., Stratford J. A., Waterhouse K. S. and Vogt N. B., 1989. Organic contaminants in Welsh soil: polynuclear aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology*, 23, 540-550.
- Juhasz A. L., Britz M. L. and Stanley G. A., 1997. Degradation of benzo(a)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene and coronene by *Burkholderia cepacia*. *Water Science and Technology*, 36, 45-51.
- Juhasz A. L. and Naidu R., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 45, 57-88.
- Juste C., Chassin P., Gomez A., Linières M. and Mosquot B., 1995. Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduares de stations d'épuration urbaines. Rapport INRA - ADEME. 209 p.

**-K-**

- Kabata-Pendias A. and Pendias H., 1992. Trace elements in soils and plants. CRC Press Inc, London. 413 p.
- Kämpfer P., Steiof M., Becker P. M. and Dott W., 1993. Characterization of chemoheterotrophic bacteria associated with the *in situ* bioremediation of a waste-oil contaminated site. *Microbial Ecology*, 26, 161-188.
- Kanally R. A. and Harayama S., 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria- Minireview. *Journal of Bacteriology*, 182, 2059-2067.
- Karickhoff S. W., Brown D. S. and Scott T. A., 1979. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water research*, 13, 241-248.
- Karldorf M., Kuhn A. J., Schröder W. H., Hildebrandt U. and Bothe H., 1999. Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology*, 154.

- Kästner M., Breuer-Jammali M. and Mahro B., 1994. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic hydrocarbons (PAH). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41, 267-273.
- Keith L. H. and Teilliard W. A., 1979. Priority pollutants. I. A perspective view. *Environmental Science and Technology*, 13, 416-423.
- Kelly D. P., Wood A. P. and Stackebrandt E., 2005. Genus II. *Thiobacillus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology-the Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilon-proteobacteria*. Brenner D.J., Krieg N.R. and Staley J.T. eds. Springer, New York. 2800 p.
- Kelsey J. W. and Alexander M., 1997. Declining bioavailability and inappropriate estimation of risk of persistent compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 582-585.
- Kelsey J. W., Kottler B. D. and Alexander M., 1997. Selective chemical extractant to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environmental Science and Technology*, 31, 214-217.
- Kent A. D. and Triplett E. W., 2002. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Reviews of Microbiology*, 56, 211-236.
- Khalil S., Loynachan T. E. and Tabatabai M. A., 1994. Mycorrhizal dependency and nutrient uptake by improved and unimproved corn and soybean cultivars. *Agronomy Journal*, 86, 949-958.
- Khan F. I., Husain T. and Hejazi R., 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management*, 71, 95-122.
- Killham K. and Firestone M. K., 1986. Vesicular arbuscular mycorrhizal mediation of grass response to acid and heavy metal deposition. *Plant Soil*, 72, 39-48.
- Kim E. J., Oh J. E. and Chang Y. S., 2003. Effects of forest fire on the level and distribution of PCDD/Fs and PAHs in soil. *The Science of the Total Environment*, 311, 177-189.
- Kirk J. L., Beaudette L. A., Hart M., Moutoglou P., Klironomos J. N., Lee H. and Trevors J. T., 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58, 2169-2188.
- Kirk J. L., Klironomos J. N., Lee H. and Trevors J. T., 2002. Phytotoxicity assay to assess plant species for phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Bioremediation Journal*, 6, 57-63.
- Kirk J. L., Klironomos J. N., Lee H. and Trevors J. T., 2005. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environmental Pollution*, 133, 455-465.

- Kolbs M. and Harms H., 2000. Metabolism of fluoranthene in different plant cell cultures and intact plants. *Environmental Science and Chemistry*, 19, 1304-1310.
- Koomen I., McGrath S. P. and Giller K. E., 1990. Mycorrhizal infection of clover is delayed in soils contaminated with heavy metals from past sewage sludge applications. *Soil Biology and Biochemistry*, 22, 871-873.
- Kopczynski E. D., Bateson M. M. and Ward D.M., 1994. Recognition of chimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms. *Applied Environmental Microbiology*, 60, 746-748.
- Kördel W., 1997. Fate and effects of contaminants in soils as influence by natural organic material: Status of information. *Chemistry international*, 19, 136-140.
- Koske R. E. and Gemma J. N., 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research*, 92, 486-505.
- Kottermann M. J. J., Heessels E., de Jong E. and Field J. A., 1994. The physiology of anthracene biodegradation by the white rot fungus *Bjerkandera* sp strain BOS55. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42, 179-186.
- Kowalchuck G. A., Gerards S. and Woldendorp J. W., 1997. Detection and characterisation of fungal infections of *Ammophila arenaria* (marram Grass) roots by denaturing gradient gel electrophoresis of specifically amplified 18S rDNA. *Applied and Environment Microbiology*, 63, 3858-3865.
- Kowalchuck G. A., De Souza F. A. and Van Veen J. A., 2002. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Molecular Ecology*, 11, 571-581.
- Kozdroj J. and van Elsas J. D., 2000. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 1405-1417.
- Krein A. and Shorer M., 2000. Road runoff pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and its contribution to river sediments. *Water Research*, 16, 4110-4115.
- Kucey R. M. N. and Paul E. A., 1982. Carbon flow, photosynthesis, and N<sub>2</sub> fixation in mycorrhizal and nodulated faba beans (*Vicia faba* L.). *Soil Biology and Biochemistry*, 14, 407-412.
- Kuzyakov Y., Friedel J. K. and Stahr K., 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 1485-1498.

**-L-**

- Laheurte F. and Berthelin J., 1988. Effect of phosphate solubilizing bacteria on maize growth and root exudation over four levels of labile phosphorous. *Plant and Soil* 105, 11-17.
- Lappin H. M., Greaves M. P. and Slater J. H., 1985. Degradation of the herbicide mecoprop [2-(2-methyl-4-chlorophenoxy) propionic acid] by a synergistic microbial community. *Applied Environmental Microbiology*, 49, 429-433.
- Lasat M. M., 2002. Phytoextraction of Toxic Metals: A review of biological mechanisms. *Journal Environmental Quality*, 31, 109-120.
- Lee B. D. and Hosomi M., 2001. Fenton oxidation of ethanol-washed distillation-concentrated benzo[a]pyrene: reaction product identification and biodegradability. *Water research*, 35, 2314-2319.
- Lehto M. K., Puhakka A. J. and Lemmetyinen H., 2003. Biodegradation of selected UV irradiated and non-irradiated polycyclic aromatics hydrocarbons (PAHs). *Biodegradation*, 14, 249-263.
- Leyval C., 1988. Interactions bactéries-mycorhizes dans la rhizosphère du pin sylvestre et du hêtre : incidences sur l'exsudation racinaire et l'altération des minéraux. Thèse de doctorat en Sciences, Université Henri Poincaré, Nancy. 263 p.
- Leyval C., Berthelin J., Schontz D., Weissenhorn I. and Morel J-L., 1991. Influence of endomycorrhizas on maize uptake of Pb, Cu, and Cd applied as mineral salts and sewage sludge. In *Heavy metal in the environment*. Wiken R.D., Forstner U. and Knochel A. Farmer J. ed, CEP Consultants Ltd. Edinburgh. pp 204-207.
- Leyval C., Weissenhorn I., Berthelin J. and Dexheimer J., 1994. Influence des métaux lourds sur la germination des spores de champignons endomycorhiziens à arbuscules dans les sols. *Acta Botanica Gallica*, 141, 523-528.
- Leyval C., Haselwandter K. and Turnau K., 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza*, 7, 139-153.
- Leyval C. and Binet P., 1998. Effect of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in soil on arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Environmental Quality*, 25, 212-219.
- Leyval C. and Joner E. J., 2001. Bioavailability of heavy metals in the mycorrhizosphere. In *Trace elements in the rhizosphere*. Gobran G., Wenzel W.W. and Lombi E. eds. CRC Press LLC, Boca Raton. 321 p.

- Leyval C., Joner E. J., Del Val C. and Haselwandter K., 2002. Potential of arbuscular mycorrhizal fungi for bioremediation. In *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Gianinazzi S., Barea J.M. and Haselwandter K. eds. Springer Verlag, Basel. 368p.
- Leyval C. 2005. Pollutions organiques agricoles, urbaines ou industrielles: cas des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Chapitre 19 In : *Sols et environnement* Girard M-C., Walter C., Remy J. C., Berthelin J., Morel J-L. eds. DUNOD. 816 p.
- Li J. and Chen B. H., 2002. Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants. *Chemical Engineering Science*, 57, 2825-2835.
- Lincoln R., Bowshall G. and Clark P., 1998. *A dictionary of Ecology. Evolution and systematics*, Cambridge. 361 p.
- Linderman R. G., 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. In *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. Bethlenfalvay G.J. and Linderman R.G. ASA special publication, Madison. pp 45-70
- Liste H. H. and Alexander M., 2000a. Accumulation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere soil. *Chemosphere*, 40, 11-14.
- Liste H. H. and Alexander M., 2000b. Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere*, 40, 7-10.
- Lock K. and Janssen C. R., 2003. Influence of ageing on zinc bioavailability in soils. *Environmental Pollution*, 126, 371-374.
- Lopez-Gutierrez J. C., Henry S., Hallet S., Martin-Laurent F., Catroux G. and Philippot L., 2004. Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 57, 399-407.
- Lum M. R. and Hirsch A. M., 2003. Roots and their symbiotic microbes: strategies to obtain nitrogen and phosphorus in a nutrient-limiting environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21, 368-382.
- Luthy R. G., Aiken G. R., Brusseau M. L., Cunningham S. D., Gschwend P. M., Pignatello O. J. J., Reinhard M., Traina S. J., Weber W. J. and Westall J. C., 1997. Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. *Environmental Science and Technology*, 31, 3341-3347.
- Lynch J. M., 1990. *The rhizosphere*. John Wiley and Sons Inc, Chichester. 458 p.

**-M-**

- Macek T., Mackova M. and Kas J., 2000. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances*, 18, 23-34.
- Mackay D., Shiu W. Y. and Ma K. C., 1992. Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Volume I. Lewis Publishers. Chelsea, 697p
- MacLeod C. J. A. and Semple K. T., 2000. Influence of contact time on extractability and degradation of pyrene in soils. *Environmental Science and Technology*, 34, 4952-4957.
- MacNaughton S. J., Stephen J. R., Venosa A. D., Davis G. A., Chang Y-J. and White D. C., 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied Environmental Microbiology*, 65, 3566-3574.
- Maliszewska-Kordybach B. and Smreczak B., 2003. Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Environment International*, 28, 719-728.
- Mallakin A., McConkey B. J., Miao G., Mckibben B., Snieckus V., Dixon D. G. and Greenberg B. M., 1999. Impacts of structural photomodification on the toxicity of environmental contaminants: anthracene photooxidation products. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 43, 204-212.
- Mansfeld-Giese K., Larsen J. C. and Bødker L., 2002. Bacterial populations associated with mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *FEMS Microbiology Ecology*, 41, 133-140.
- Marschner B., 1995 Bodenchemische und biologische Einflubfaktoren der Freisetzung von PAK und PCB in einem Rieselfeldboden. *Mitteilung. Deutsche Bodenkundliche Gesellschaft* 76, 365-368.
- Marschner B., 1999. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB) in soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 162, 1-14.
- Marschner B. and Crowley D. E., 1996. Physiological activity of a bioluminescent *Pseudomonas fluorescens* (strain 2-79) in the rhizosphere of mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum*). *Soil Biology and Biochemistry*, 28, 869-876.
- Marschner B., Crowley D. E. and Higashi R. M, 1997. Root exudation and physiological status of a root-colonizing fluorescent pseudomonad in mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant and Soil*, 189, 11-20.

- Marschner P., Yang C-H., Lieberei R. and Crowley D. E., 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 33, 1437-1445.
- Masten S. J. and Davies S. H. R., 1997. Efficacy of in-situ ozonation for the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soils. *Journal of Contaminant Hydrology*, 28, 327-335.
- McGrath S. P., Chaudri A. M. and Giller K. E., 1995. Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. *Journal of Industrial Microbiology*, 14, 94-104.
- McGrath S. P., Zhao F. J. and Lombi E., 2001. Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant and Soil*, 232, 207-214.
- McLaren R. G., Swift R. S. and Quin B. F., 1984. EDTA-extractable copper, zinc and manganese in soils of the Canterbury Plains. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 27, 207-217.
- Meador J. P., Stein J. E., Reichert W. L. and Varanasi U., 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 143, 79-165.
- Medeiros C. A. B., Clark R. B. and Ellis J. R., 1994. Effects of excess manganese on mineral uptake in mycorrhizal sorghum. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 17, 2203-2219.
- Menzie C. A., Potocki B. B. and Santodonato J., 1992. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental Science and Technology*, 26, 1278-1284.
- Meyer J. R. and Linderman R. G., 1986. Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 18, 191-196.
- Meyer J. R., Moser R., Neef A., Sthal U. and Kampfer P., 1999. Differential detection of key enzymes of polyaromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. *Microbiology*, 145, 1731-1741.
- Meyerhans A., Vartanian J-P. and Wain-Hobson S., 1990. DNA recombination during PCR. *Nucleic Acid Research*, 18, 1687-1691.
- Miller K. M., Ming T. J., Schulze A. D. and Withler R. E., 1999. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DDGE): a rapid and sensitive technique to screen nucleotide sequence variation in populations. *BioTechniques*, 27, 1016-1030.

- Miya R. K. and Firestone M. K., 2001. Enhanced phenanthrene biodegradation in soil by Slender Oat root exudates and root debris. *Journal of Environmental Quality*, 30, 911-1918.
- Morgan C. A., Hudson A., Konopka A. and Knakatsu C. H., 2002. Analyses of microbial activity in biomass-recycle reactors using denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA and 16S rRNA PCR products. *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 333-341.
- Mori H., Isono K., Horiuchi T. and Miki T., 2000. Functional genomics of *Escherichia coli* in Japan. *Research in Microbiology*, 151, 121-128.
- Morton J. B. and Benny G. L., 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Zygomycetes*): a new order of *Glomales* and *Gigasporinae* and two new families of *Glomaceae*. *Mycotaxon*, 37, 471-491.
- Mosse B., 1959. The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an *Endogone* sp. causing vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Transactions of the British Mycological Society*, 42, 273-286.
- Motelay-Massei A., Ollivon D., Garban B., Teil M. J., Blanchard M. and Chevreuil M., 2004. Distribution and spatial trends of PAHs and BPCs in soils in the Seine River basin, France. *Chemosphere*, 55, 555-565.
- Mugwira I. M., Elgwhary S. M. and Patel S. U., 1978. Aluminium tolerance in triticale, wheat, and rye as measured by root growth characteristics and aluminium concentration. *Plant and Soil*, 50, 681-690.
- Mulligan C. N., Yong R. N. and Gibbs B. F., 2001. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*, 60, 193-207.
- Murray A. E., Hollibaugh J. T. and Orrego C., 1996. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied Environmental Microbiology*, 62, 2676-2680.
- Muyzer G., Waal E. C. D. and Uitterlinden A. G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, 59, 695-700.
- Muyzer G., Teske A., Wirsén C. O. and Jannasch H. W., 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology*, 164, 165-172.

**-N-**

- Newman L. A. and Reynolds C. M., 2004. Phytodegradation of organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 225-230.
- Nichols T. D., Wolf D. C., Rogers H. B., Beyrouthy C. A. and Reynolds C. M., 1997. Rhizosphere microbial population in contaminated soil. *Water Air Soil Pollution*, 95, 165-178.
- Nielsen T., Jorgensen H. E., Larsen J. C. and Poulsen M., 1996. City air pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and other mutagens: occurrence, source and health effects. *Science of Total Environment*, 189/190, 41-49.

**-O-**

- Oades J. M., 1978. Mucilages at the root interface. *Journal of Soil Science*, 29, 1-6.
- Olexa T. J., Gentry T. J., Hartel P. G., Wolf D. C., Fuhrmann J. J. and Reynolds C. M., 2000. Mycorrhizal colonization and microbial community structure in the rhizosphere of annual ryegrass grown in pyrene-amended soils. *Internal Journal of Phytoremediation*, 2, 213-231.
- Ophoff H., Storkork A., Veerkamp W. and Fuhr F., 1996. Volatilization and mineralization of [3-<sup>14</sup>C] fluoranthene after soil incorporation and soil surface application. *Internal Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 64, 97-109.
- Ouziad F., Hildebrandt U., Schmelzer E. and Bothe H., 2005. Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology*, 162, 634-649.

**-P-**

- Pääbo S., Irwin D. M. and Wilson A. C., 1990. DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 4718-4721.
- Paradis R., Dalpé Y. and Charest C., 1995. The combined effect of arbuscular mycorrhizas and short-term cold exposure on wheat. *New Phytologist*, 129, 637-642.
- Park J. W. and Crowley D. E., 2006. Dynamic changes in nahAc gene copy numbers during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 1322-1329.

- Parrish Z. D., Banks M. K. and Schwab A. P., 2005. Assessment of contaminant lability during phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon impacted soil. *Environmental Pollution*, 137, 187-197.
- Patten C. L. and Glick B. R., 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 207-220.
- Paul E. A. and Clark F. E., 1996. *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, New York, NY. 340 p.
- Pawlowska T. E. and Charvat I., 2004. Heavy-Metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhiza fungi. *Applied Environmental Microbiology*, 70, 6643-6649.
- Perrin J., 2003. Effet de la mycorhization par *Glomus intraradices* sur la croissance de *Medicago sativa* L. et sur les communautés bactériennes rhizosphériques dans un sol industriellement pollué. Rapport de Diplôme d'Etude Approfondies en Sciences Agronomiques, INPL-ENSAIA, Nancy. 27 p.
- Piccini D. and Azcon R., 1987. Effect of phosphate - solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the utilization of Bayovar rock phosphate by alfalfa plant using a sand-vermiculite medium. *Plant and Soil*, 101, 45-50.
- Pignatello J. J., 1998. Soil organic matter as a nanoporous sorbent of organic pollutants. *Advances in Colloid and Interface Science*, 76/77, 445-467.
- Pignatello J. J. and Xing B., 1996. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. Critical review. *Environmental Science and Technology*, 30, 1-11.
- Piña J., Merino J., Errazu A. F. and Bucala V., 2002. Thermal treatment of soils contaminated with gas oil: influence of soil composition and treatment temperature. *Journal of Hazardous Materials*, 94, 273-290.
- Pinton R., Varanini Z. and Nannipieri P., 2001. *The rhizosphere*, New York.
- Pirozynski K. A. and Dalpé Y., 1989. Geological history of the Glomacaea with particular reference to mycorrhizal symbiosis. *Symbiosis*, 7, 1-36.
- Popp N., Schlömann M. and Mau M., 2006. Bacterial diversity in the active stage of a bioremediation system for mineral oil hydrocarbon-contaminated soil. *Microbiology*, 152, 3291-3304.
- Prach K. and Pyšek P., 2001. Using spontaneous succession for restoration of human-disturbed habitats, Experience from Central Europe. *Ecological Engineering*, 17, 55-62.
- Pradhan S. P., Conrad J. R., Paterek J. R. and Srivastava V. J., 1998. Potential of phytoremediation for treatment of PAHs in soil at MGP sites. *Journal of Soil Contamination*, 7, 467-480.

Providenti M. A., Lee H. and Trevors J. T., 1993. Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 12, 379-395.

Providenti M. A., Greer C. W., Lee H. and Trevors J. T., 1995. Phenanthrene mineralization by *Pseudomonas* sp. UG 14. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 271-279.

**-R-**

Ramadahl T., Alfheim I., Rustad S. and Olsen T., 1982. Chemical and biological characterisation of emissions from small residential stoves burning wood and charcoal. *Chemosphere*, 11, 601-611.

Rao P S C 1990. Sorption of organic contaminants. *Wat. Sci. Tech.* 22, 1-6.

Ravnskov S, Nybroe O and Jakobsen I 1999 Influence on arbuscular mycorrhizal fungus on *Pseudomonas fluorescens* DF57 in rhizosphere and hydrosphere soil. *New Phytologist* 142, 113-122.

Rebrikov D. V. and Trofimov D. Y., 2006. Real-Time PCR: A Review of Approaches to Data Analysis. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42, 455-463.

Reddy K. R., Admas J. F. and Richardson C., 1999. Potential technologies for remediation of Brownfield. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, 3, 61-68.

Redecker D., Morton J. B. and Bruns T. D., 2000. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14, 276-284.

Regvar M., Vogel-Mikus K., Kugonic N., Turk B. and Batic F., 2006. Vegetational and mycorrhizal successions at a metal polluted site: Indications for the direction of phytostabilization? *Environmental Pollution*, 144, 976-984.

Reid B. J., Jones K. C. and Semple K. T., 2000. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments - a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environmental Pollution*, 108, 103-112.

Reilley K. A., Banks M. K. and Schwab A. P., 1996. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *Journal of Environmental Quality*, 25, 212-219.

Ren L., Huang X. D., McConkey B. J., Dixon D. G. and Breenberg B. M., 1994. Photoinduced toxicity of three polycyclic aromatic hydrocarbons (fluoranthene, pyrene, and naphthalene) to the duckweed *Lemna gibba* L. G-3. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 28, 160-171.

- Renoux A. Y., Millette D., Tyagy D. and Samson R., 1999. Detoxification of fluorene, phenanthrene, carbozole and p-cresol in columns of aquifer sand as studied by the Microtox® assay. *Water research*, 33, 2045-2052.
- Rhodes L. H. and Gerdemann J. W., 1975. Phosphate uptake zones of mycorrhizal and non mycorrhizal onions. *New Phytologist*, 75, 555-561.
- Ricken B. and Höfner W., 1996. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on heavy-metal tolerance of alfalfa *Medicago sativa* L. and oat *Avena sativa* L. on a sewage treated soil. *Zeitschrift für Pflanzenernahrung und Bokenkunde*, 159, 189-194.
- Rillig M. C. and Mummey D. L., 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*, 171, 41-53.
- Riser-Roberts E., 1998. *Remediation of Petroleum-Contaminated Soils: Biological, Physical, and Chemical Processes*. Lewis Publishers, Boca Raton. 542 p.
- Rondon M. R., August P. R., Bettermann A. D., Brady S. F., Grossman T. H., Liles M. R., Loiacono K. A., Lynch B. A., MacNeil I. A., Minor C., Tiong C. L., Gilman M., Osburne M. S., Clardy J., Handelsman J. and Goodman R. M., 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 2541-2547.
- Ross J. P., 1980. Effect of nontreated soil on sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with soybean. *Phytopathology*, 70, 1200-1205.
- Rost H., Loibner A. P., Hasinger M., Braun R. and Szolar O. H. J., 2002. Behavior of PAHs during cold storage of historically contaminated soil samples. *Chemosphere*, 49, 1239-1246.
- Rouatt J. W. and Katznelson H., 1961. A study of the bacteria on the root surface and in the rhizosphere soil of crop plant. *Journal of Applied Bacteriology*, 24, 164-171.
- Rovira A. D., 1956. Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect, I. The nature of root exudates from oat and peas. *Plant and Soil*, 7, 178-194.
- Rovira A. D., 1959. Root excretions in relation to the rhizosphere effect, IV. Influence of plant species, age of plant, light, temperature, and calcium nutrition on exudation. *Plant and Soil*, 11, 53-64.
- Rovira A. D., 1965. Interaction between plant root and soil microorganism. *Annual Reviews of Microbiology*, 19, 241-266.
- Rovira A. D., 1969. Plant root exudates. *The Botanical Review*, 35, 35-57.
- Rovira A. D. and Davey C. B., 1971. Biology of the rhizosphere. In *The Plant root and its Environment*, Ed C E.W. University Press of Virginia, Charlottesville.

- Rovira A. D. and Campbell R., 1974. Scanning electron microscopy of microorganisms on the root of wheat. *Microbial Ecology*, 1, 15-23.
- Rovira A. D., Foster R. C. and Martin J. K., 1979. Origine, nature and nomenclature of organic material in the rhizosphere. In *The soil root interface*, Ed R R S a H J.L. pp 1-4. Academic Press Inc., New York.
- Rovira A. D., Bowen G. D. and Foster R. C., 1983. The significance of rhizosphere microflora and mycorrhizal in plant nutrition. In *Inorganic Plant Nutrition. Encyclopedia of Plant Physiology*, Ed L A B R.L. pp 61-93. Springer.
- Ruiz-Lozano J. M., 2003. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza*, 13, 309-317.

**-S-**

- Saison C., Perrin-Ganier C., Amellal S., Morel J-L. and Schiavon M., 2004. Effect of metals on the adsorption and extractability of <sup>14</sup>C-phenanthrene in soils. *Chemosphere*, 55, 477-485.
- Saito A., Iwabuchi T. and Harayama S., 2000. A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. KP7: expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 182, 2134-2141.
- Salt D. E., Smith R. D. and Raskin I., 1998. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 643-668.
- Samanta S. K., Singh O. M. and Jain R. K., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation - review. *Trends in Biotechnology*, 20, 243-248.
- Sandaa R-A., Torsvik V., Enger O., Daae F. L., Castberg T. and Hahn D., 1999. Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiology Ecology*, 30, 237-251.
- Sandermann H., 1994. Higher plant metabolism of xenobiotics: the "green liver" concept. *Pharmacogenetics*, 4, 225-241.
- Santodonato J., Howard P. and Basu D., 1981. Health and ecological assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, 5, 1-368.
- Sardin 2000. In *Pollution localisée des sols et des sous-sols par les hydrocarbures et par les solvants chlorés*, Ed C Colin, Paris.

- Saul D., Aislabie J. M., Brown C. E., Harris L. and Foght J. M., 2005. Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 53, 141-155.
- Schenck N. C. and Smith G. S., 1982. Responses of six species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and their effects on soybean at four soil temperatures. *New Phytologist*, 92, 193-201.
- Schneider K. J., Oltmanns J., Radenberg T. and Pauly-Mundegar D., 1996. Uptake of nitroaromatic compounds in plants. Implications for risk assesment of ammunition sites. *Environmental Science and Pollution Research International*, 3, 135-138.
- Schnoor J. L., Licht L. A., McCutcheon S. C., Wolfe N. L. and Carreira L. H., 1995. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science and Technology*, 29, 318-323.
- Schroll H., Bierling B., Cao G., Lahaniati M., Langenbach T., Scheunert I. and Winkler R., 1994. Uptake pathways of organic chemicals from soil by agricultural plants. *Chemosphere*, 28, 297-303.
- Schübler A., Gehrig H., Schwarzott D. and Walker C., 2001. Analysis of partial Glomales SSU rDNA gene sequences: implications for primer design and phylogeny. *Mycological Research*, 105, 5-15.
- Schübler A, Schwarzott D and Walker C 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105, 1413-1421.
- Schübler A., Schwarzott D. and Walker C., 2002. Phylogeny and evolution of AM fungi. In *COST Action*, Cologne, 2002. pp 23-25.
- Schüepp H., Dehn B. and Sticher H., 1987. Interaktionen zwischen VA-Mykorrhizen und Schwermetallbelastungen. *Angewandte Botanik*, 61, 85-96.
- Schwab A. P., Al-Assi A. A. and Banks M. K., 1998. Adsorption of naphtalene onto plant roots. *Journal of Environmental Quality*, 27, 220-224.
- Schwab A. P. and Banks M. K., 1994. Biologically mediated dissipation of polyaromatic hydrocarbons in the root zone. In *Bioremediation through rhizosphere technology*, Anderson T.A. and Coats J.R. eds. American Chemical Society, Washington. 216 p.
- Schwarzott D., Walker C. and Schübler A., 2001. Glomus, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21, 190-197.
- Secilia J. and Bagyaraj D. J., 1987. Bacteria and actinomycetes associated with pot cultures of vesicular arbuscular mycorrhizas. *Canadian Journal of Microbiology*, 33, 1069-1073.

- Shann J. R. and Boyle D., 1994. Influence of plant species on in situ rhizosphere degradation. In *Bioremediation through rhizosphere technology*. Anderson T.A. and Coats. J. R. American Chemical Society, Washington. 216 p.
- Shaw G. R. and Connell D W., 1994. Prediction and monitoring of the carcinogenicity of polycyclic aromatic compounds (PACs). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 135, 1-62.
- Shen G., Lu Y., Zhou Q. and Hong J., 2005. Interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals on soil enzyme. *Chemosphere*, 61, 1175-1182.
- Shetty K. G., Hetrick B. A. D. and Schwab A. P., 1995. Effects on mycorrhiza and other fertilizer amendments on zinc tolerance of plants. *Environmental Pollution*, 88, 307-314.
- Shiaris M. P. and Jambard-Sweet D., 1986. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surficial sediments of Boston Harbour, MA, USA. *Marine Pollution Bulletin*, 17, 469-472.
- Shimp J. F., Tracy J. C., Davis L. C., Lee E., Huang W, Erickson L. E. and Schnoor J.L., 1993. Beneficial effects of plants in the remediation of soil and groundwater contaminated with organic materials. *Environmental Science and Technology*,. 23, 41-77.
- Siciliano S. D. and Germida J. J., 1997. Bacterial inoculants of forage grasses enhance degradation of 2-chlorobenzoic acid in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 1098-1104.
- Siciliano S. D., Theoret C. M., de Freitas J. R., Hucl P. J. and Germida J. J., 1998. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 844-851.
- Siciliano S. D. and Germida J. J., 1999. Enhanced phytoremediation of chlorobenzoates in rhizosphere soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 299-305.
- Siciliano S. D., Germida J. J., Banks M. K. and Greer C. W., 2003. Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Applied Environmental Microbiology*, 59, 4211-4215.
- Sieverding E., 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. In *Schriftenreihe der GTZ, GmbH, Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit*. 224 p.
- Simon L., Bousquet J. and Levesque R. C., 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and consequence with vesicular land plants. *Nature*, 363, 67-69.
- Simon L., Lalonde M. and Bruns T. D., 1992. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environment Microbiology*, 58, 291-295.

- Simonich S. L. and Hites R. A., 1994. Vegetation - atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology*, 28, 939-943.
- Simpson D. and Daft M. J., 1990. Interactions between water-stress and different mycorrhizal development in maize and sorghum. *Plant and Soil*, 121, 179-186.
- Sims R. C. and Overcash M. R., 1983. Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plants systems. *Residue Reviews*, 88, 1-68.
- Singer A. C., Crowley D. E. and Thompson I. P., 2003. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends in Biotechnology*, 21, 123-130.
- Smith M. J., Flowers T. H., Duncan H. J. and Alder J., 2006. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. *Environmental Pollution*, 141, 519-525.
- Smith R. V. and Rosazza J. P., 1974. Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 161, 551-558.
- Smith S. E. and Read D. J., 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Harcourt Brace & Company, Cambridge.
- Smreczak B., Maliszewska-Kordybach B. and Martyniuk S., 1999. Effect of PAHs and heavy metals on activity of soil microflora. In *Bioavailability of organic xenobiotics in the environment*. Block J.C., Goncharuk V.V., and Baveye P. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. 503 p.
- Smreczak B. and Maliszewska-Kordybach B., 2003. Seeds germination and root growth of selected plants in PAH contaminated soil. *Fresenius Environmental Bulletin*, 12, 946-949.
- Sokhn J., De Leij F. A. A. M., Hart T. D. and Lynch J. M., 2001. Effect of copper on the degradation of phenantrene by soil micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 164-168.
- St Arnaud M., Hamel C., Vimard B., Caron M. and Fortin J. A., 1995. Altered growth of *Fusarium oxysporum f. sp. Chrysanthemi* in an in vitro dual culture system with the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* growing in *Daucus carota* transformed roots. *Mycorrhiza*, 5, 431-438.
- Staddon W. J., Duchesne L. C. and Trevors J. T., 1996. Conservation of forest soil microbial diversity: the impact of fire and research needs. *Environmental Reviews*, 5, 79-87.
- Sun H., Taleda M., Ike M. and Fujita M., 2003. Short- and long-term sorption/desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons onto artificial solids: effects of particle and pore size and organic matters. *Water Research*, 37, 2960-2968.

Sutherland J. B., Rafii F., Khan A. A. and Cerniglia C. E., 1995. Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. In *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. Cerniglia, L. Y. Young and C. E. eds. John Wiley and Sons, New York. 672 p.

Sylvia D. M. and Williams S. E., 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stresses. In *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. Bethlenfalvay, G.J. and Linderman, eds. American Society of Agronomy, Madison. 124 p.

**-T-**

Theron J. and Cloete T. E., 2000. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Critical Reviews in Microbiology*, 26, 37-57.

Thioulouse J., Chessel D., Doledec S. and Olivier J. M., 1997. ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing*, 7, 75-83.

Thompson I. P., Bailey M. J., Boyd E. M., Maguire N., Meharg A. A. and Ellis J. R., 1999. Concentration effects of 1,2-dichlorobenzene on soil microbiology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 1891-1898.

Thompson J. D., Higgins G. D. and Gibson D. T., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.

Tisdall J. M. and Oades J. M., 1979. Stabilization of soil aggregates by root systems of ryegrass. *Australian Journal of Soil Research*, 17, 429-441.

Tommerup I. C., 1985. Inhibition of germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Transactions of the British Mycological Society*, 85, 267-278.

Tordoff G. M., Baker I. A. and Willis A. J., 2000. Current approaches to the revegetation of metalliferous wastes. *Chemosphere*, 41, 219-228.

Trapido M., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Estonian soil: contamination and Profiles. *Environmental Pollution*, 105, 67-74.

Tremolada P., Burnett V., Alamari D. and Jones K. C., 1996. Spatial distribution of PAHs in the UK atmosphere using pine needles. *Environmental Science and Technology*, 30, 3570-3577.

Trolldenier G., 1975. Influence de la fumure minérale sur l'équilibre biologique dans la rhizosphère. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 122, 157-167.

- Trouvelot A., Kough J. L. and Gianinazzi-Pearson V., 1985. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In Aspects physiologiques et génétiques des mycorhizes - Actes du premier symposium Européen sur les mycorhizes, Paris, 1985. Ed Gianinazzi. pp 217-221.
- Tuchackova J., Cajthaml T., Novak K., Novotny C., Mertelik J. and Sasek V., 2001. Hydrocarbons deposition and soil microflora as affected by highway traffic. *Environmental Pollution*, 113, 255-262.
- Tulasne L. R. and Tulasne C., 1844. Fungi nonnulli hipogaei, novi v. mignus cogniti auct. *Giornale Botanico Italiano*, 2, 55-63.
- V-
- Van Brummelen T. C., Verweij R. A., Wedzinga S. A. and Van Gestel C. A. M., 1996. Enrichment of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest soils near a blast furnace plant. *Chemosphere*, 32, 293-314.
- Van den Leemkule M. A., Van Hesteren S. and Pruiksma M. A., 1998. Minimum soil quality: a use-based approach from ecological perspectives: Part 2. Immobile organic micro-pollutants. Technical soil protection committee - The Netherlands.
- Van der Putten W. H., Mortimer S. R., Hedlund K., Van Dijk C., Brown W. K., Leps J., Rodriguez-Barrueco C., Roy J., Diaz Len T. A., Gormsen D., Korthals G. W., Lavorel S., Santa Regina I. and Smilauer P., 2000. Plant species diversity as a driver of early succession in abandoned fields, a multi-site approach. *Oecologia*, 124, 91-99.
- Van Tuinen D., Jacquot E., Zhao B., Gollotte A. and Gianinazzi-Pearson V., 1998. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Molecular Ecology*, 7, 879-887.
- Vandenkoornhuyse P., 1998. Approche de la diversité inter- et intraspécifique des champignons mycorrhiziens à arbuscules. In *Géomicrobiologie et Ecologie Moléculaire*. Henri Poincaré, Nancy.
- Vandenkoornhuyse P. and Leyval C., 1998. SSU rDNA sequencing and PCR-fingerprinting reveal genetic variation within *Glomus mosseae*. *Mycologia*, 90, 791-797.
- Venkataraman C., Negi G., Sardar S. B. and Rasogi R., 2002. Size distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol emissions from biofuel combustion. *Aerosol Science*, 33, 503-518.

- Verdin A., Sahraoui A. L-H., Fontaine J., Grandmougin-Ferjani A. and Durand R., 2006. Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation. *Mycorrhiza*, 16, 397-405.
- Vierle O., Launhart T., Strehler A., Dumler-Gradl R., Thoma H. and Schreiner M., 1999. Investigation of organic pollutants from house heating systems using biogenic fuels and correlation with other exhaust gaz components. *Analytic Chimica Acta*, 393, 131-140.

**-W-**

- Walton B. T., Guthrie E. A. and Hoylman A. M., 1994. Toxicant degradation in the rhizosphere. In *Bioremediation through rhizosphere technology*, Anderson T.A. and Coats J.R. eds. American Chemical Society, Washington. 216 p.
- Wang A. M., Doyle M. V. and Mark D. F., 1989. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction [published erratum appears in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990. 87:2865]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 9717-9721.
- Wang G. M., Stribley D. P., Tinker P. B. and Walker C., 1993. Effects of pH on arbuscular mycorrhiza. I. Field observations on the long-term liming experiments at Rothamsted and Woburn. *New Phytologist*, 124, 465-472.
- Watanabe M., Terramoto M., Futumata H. and Harayama S., 1998. Molecular detection, isolation and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Applied Environmental Microbiology*, 64, 4396-4402.
- Watanabe K., Kodama Y., Syutsubo K. and Harayama S., 2000. Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. *Applied and Environment Microbiology*, 66, 4803-4809.
- Watteau F. and Berthelin J., 1990. Iron solubilization by mycorrhizal fungi producing siderophores. *Symbiosis*, 9, 67-69.
- Weissenfelds W. D., Klewer H. J. and Langhoff J., 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradation and biotoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 689-696.
- Weissenhorn I. and Leyval C., 1994. Differential tolerance to Cd and Zn of arbuscular mycorrhizal fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soils. *Plant and Soil*, 167, 189-196.

- Weissenhorn I. and Leyval C., 1995. Root colonization by a Cd-sensitive and a Cd-tolerant *Glomus mosseae* and cadmium uptake in sand culture. *Plant and Soil*, 175, 233-238.
- Weissenhorn I., Mench M. and Leyval C., 1995. Bioavailability of heavy metals and arbuscular mycorrhiza in a sewage-sludge-amended sandy soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 27, 287-296.
- Wenzel W. W., Adriano D. C., Salt D. E. and Smith R. D., 1999. Phytoremediation: a plant-microbe-based remediation system. In *Bioremediation of contaminated soils*.
- White J. C., Alexander M. and Pignatello J. J., 1999. Enhancing the bioavailability of organic compounds sequestered in soil and aquifer solids. *Environmental Science and Technology*, 18, 182-187.
- Whitfield L., Richards A. J. and Rimmer D. L., 2003. Relationships between soil heavy metal concentration and mycorrhizal colonization in *Thymus polytrichus* in northern England. *Mycorrhiza*, 14, 55-62.
- Wiken R.D., Forstner U. and Knochel A., 1991. Heavy metal in the environment. Farmer J. ed, CEP Consultants Ltd. Edinburgh. pp 204-207.
- Wiegleb G. and Felinks B., 2001. Primary succession in post-mining landscapes of Lower Lusatia - chance or necessity. *Ecological Engineering*, 17, 199-217.
- Wikström P., Andersson A. C. and Forsman M., 1999. Biomonitoring complex microbial communities using random amplified polymorphic DNA and principle component analysis. *FEMS Microbiological Letters*, 28, 131-139.
- Wilcke W., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils - a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163, 229-248.
- Wild S. R., Berrow M. L., McGrath S. P. and Jones K. C., 1992. Polynuclear aromatic hydrocarbons in crops from long - term field experiments amended with sewage sludge. *Environmental Pollution*, 76, 25-32.
- Wild S. R. and Jones K., 1995. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environmental Pollution*, 88, 91-108.
- Willumsen P. A. and Karlson U., 1997. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*, 7, 415-423.
- Wilson M. S., Davis C. D., Williams D. P., Buckpitt A. R., Pirmohamed M. and Park B. K., 1996. Characterization of the toxic metabolite(s) of naphthalene. *Toxicology*, 114, 233-242.

- Wilson M. S., Bakermans C. and Madsen E. L., 1999a. In situ, real-time catabolic gene expression: Extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA transcripts from groundwater. *Applied and Environment Microbiology*, 65, 80-87.
- Wilson M. S., Tatford B. C., Yin X. Q., Rajki S. C., Walsh M. M. and LaRock P., 1999b. Species-specific detection of hydrocarbon-utilizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 39, 59-78.
- Wilson M. S., Herrick J. B., Jeon C. O., Hinman D. E. and Madsen E. L., 2003. Horizontal transfer of *phnAc* dioxygenase genes within one of two phenotypically and genotypically distinctive naphthalene-degrading guilds from adjacent soil environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2172-2181.
- Wilson S. C. and Jones K. C., 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatics hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental Pollution*, 81, 229-249.
- Wintzingerode F. V., Gobel U. B. and Stackebrandt E., 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based r-RNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21, 213-229.
- Wrenn B. A. and Venosa A. D., 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by most-probable-number procedure. *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 252-258.
- Wu S. and Gschwend P. M., 1986. Sorption kinetics of hydrophobic organic compounds to natural sediments and soils. *Environmental Science and Technology*, 20, 717-725.

**-Y-**

- Ye D., Siddiqi M. A., Maccubbin A. E., Kumar S. and Sikka H. C., 1996. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environmental Science and Technology*, 30, 136-142.
- Yen K. M. and Gunsalus I. C., 1982. Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 874-878.
- Yunker M. B., MacDonald R. W., Cretney W. J., Fowler B. R. and MacLaughlin F. A., 1993. Alkane, terpene and polycyclic aromatic hydrocarbon geochemistry of the Mackensie River and Mackensie Shelf: riverine contributions to Beaufort Sea coastal sediment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 57, 3041-3061.

**-Z-**

- Zeng Y., Hong P. K. A. and Wavrek D. A., 2000. Chemical-biological treatment of pyrene. *Water research*, 34, 1157-1172.
- Zheng C. R., Tu C. and Chen H. M., 1999. Effect of combined heavy metal pollution on nitrogen mineralization potential, urease and phosphatase activities in a typic udic ferrisol. *Pedosphere*, 9, 251-258.
- Zuniga M. C., Durham D. R. and Welch R. A., 1981. Plasmid- and chromosomemediated dissimilation of naphthalene and salicylate in *Pseudomonas putida* PMD-1. *Journal of Bacteriology*, 147, 836-843.
- Zylstra G. J., Wang X. P., Kim E. and Didolkar V. A., 1994. Cloning and analysis of genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *Annals of the New-York Academy of Sciences*, 721, 386-398.

**-SITES WEB CONSULTES-**

- <http://basol.environnement.gouv.fr/>
- <http://fr.wikipedia.org>
- <http://pbil.univ-lyon1.fr/ADE-4/ADE-4F.htm>
- <http://umbbd.ahc.umn.edu/index.html>
- <http://www.axsane.fr>
- <http://www.biogenie-env.com/fr/>
- <http://www.citepa.org/>
- <http://www.deep-green.com>
- <http://www.drire.gouv.fr/>
- <http://www.epa.gov/>
- <http://www.gisfi.prd.fr>
- <http://www.iarc.fr/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>



# Résumé

# Abstract



## RESUMÉ

De nombreux sites industriels présentent des contaminations multiples (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, Eléments en Traces Métalliques, métalloïdes) qui représentent un risque pour l'environnement et qui posent des problèmes pour leur traitement. Les techniques disponibles (ex. biopile, désorption thermique) diminuent la pollution organique, mais ne traitent pas la pollution métallique, et peuvent modifier les propriétés physico-chimiques et biologiques du sol. L'impact de ces modifications sur la capacité des plantes à se développer sur ces sols est peu étudié. La phytoremédiation, qui consiste à utiliser des plantes et les microorganismes associés pour réhabiliter des sols pollués, peut être une technique alternative ou complémentaire de traitement. Les objectifs de ce travail étaient (i) de caractériser les propriétés biologiques de sols contaminés et des mêmes sols ayant été traités par biopile et par désorption thermique, (i) d'évaluer l'effet de la mycorhization (*Glomus intraradices*) et de la fertilisation sur la capacité de la luzerne (*Medicago sativa* L.) à croître sur des sols avant et après remédiation (ii) d'étudier la dynamique des polluants dans la rhizosphère de ces plantes mycorhizées (*Glomus intraradices*) ou non et de caractériser les communautés microbiennes potentiellement impliquées et (iii) d'évaluer la recolonisation bactérienne d'un sol après un traitement par désorption thermique *in situ*.

Les sols étudiés proviennent de deux anciens sites industriels en Lorraine contaminés en HAP et dans une moindre mesure en ETM. La caractérisation des propriétés de ces sols montre des différences en terme de concentration en polluants, mais surtout des différences en terme de quantité et de structure des communautés microbiennes. Ainsi, la quantité de bactéries cultivables totales et dégradantes et le nombre de copies de gènes 16S et NDO, différent entre les sols contaminés mais sont plus faibles dans les sols traités par biopile et par désorption thermique. Des cultures de plantes en pots effectuées avec la luzerne inoculée ou non par un champignon MA et/ou fertilisée sur les différents sols ont montré que la survie et la croissance de la plante sur les sols contaminés et les sols traités étaient fortement dépendante de la mycorhization, sauf dans un sol traité par désorption thermique qui s'est révélé toxique pour la mycorhization. Dans ces expériences, si les teneurs en HAP ont diminué globalement par rapport aux sols initiaux pour toutes les modalités, c'est dans le sol non rhizosphérique que la concentration en HAP était la plus faible en fin d'expérience. Ce résultat suggère une diminution de la disponibilité des HAP dans la rhizosphère. L'inoculation par le champignon MA n'a pas eu d'effet sur la teneur en HAP, mais a réduit la concentration en ETM dans la plante. L'utilisation de différentes techniques (dénombrement, PCR-TTGE, PCR en temps réel) a montré l'impact des traitements de remédiation sur la microflore bactérienne et fongique du sol. Ainsi, dans le sol traité par désorption thermique, la présence de la plante augmente le nombre de bactéries dégradantes cultivables par rapport au sol non planté. Un suivi au cours du temps d'un sol traité par désorption thermique et stocké *in situ* a montré une recolonisation rapide mais une faible quantité de bactéries et une diversité bactérienne limitée, qui évoluent peu au cours du temps.

L'ensemble de ces résultats indique la nécessité de prendre en compte les caractéristiques physicochimiques et biologiques des sols contaminés mais aussi des sols traités. L'association plante-microorganismes et en particulier les champignons mycorhiziens sont certainement déterminants pour la remédiation et la restauration des propriétés de ces sols.



## ABSTRACT

Many former industrial sites present polluted soils contaminated by a mixture of pollutants (polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), metallic trace elements (MTE), metalloids). It represents a risk for the environment and pose problems for their treatment. Available remediation techniques (e.g. biopile, thermal desorption) decrease organic pollution but do not eliminate completely pollutants such as heavy metals. Furthermore, physicochemical and biological soil properties could be drastically affected by these treatments. The impact of these modifications on the capacity of plants to develop on these soils is still poorly studied. Phytoremediation technologies that combine beneficial effects of plants and associated soil microorganisms could be a strategy for polluted soils restoration. It could be used as alternative technique or in conjunction with other remediation technologies. The aims of this study were (i) to characterize the biological properties of contaminated soils before and after two remediation treatments (biopile and thermal desorption), (ii) to investigate the effect of mycorrhizal fungi (*Glomus intraradices*) and nutrients on the growth of alfalfa (*Medicago sativa* L.) on soils contaminated with PAH and MTE before and after remediation treatments, (iii) to study the dynamics of the pollutants in mycorrhizal and nonmycorrhizal plant rhizosphere (*Glomus intraradices*) and to characterize the microbial communities potentially involved in PAH degradation and (iv) to evaluate the bacterial soil recolonization after a thermal desorption treatment *in situ*.

We used soils from two old industrial sites in Lorraine contaminated with PAH and to a lesser extent with heavy metals. The soils exhibited differences in pollutant concentration and important differences in microbial communities quantity and structure. Thus, the quantity of total and PAH degrader bacterial population, and the 16S and NDO (naphthalene dioxygenase) gene copy numbers differed between contaminated soils and were lower in the biopile and thermal desorption treated soils. In pot experiments, the soils were planted or not with alfalfa (*Medicago sativa* L.), inoculated or not with *Glomus intraradices* and fertilised or not. These experiments highlighted that the survival and the growth of the plant on the contaminated and treated soils were strongly dependent on the mycorrhization, except for one soil treated by thermal desorption which appeared toxic for the mycorrhization. The total PAH contents decreased in these experiments compared to the initial soils for all the methods. However, the PAH concentration was lower in the non rhizospheric soil at the end of the experiment, suggesting a reduction of the PAH availability in the rhizosphere. The AM fungi inoculation had no effect on the PAH contents but reduced the heavy metals concentrations in plants. The various techniques used (enumeration, PCR-TTGE, real-time PCR) showed the impact of the remediation treatments on the bacterial and the fungal population in soils. Thus, in the soil treated by thermal desorption, the presence of the plant increased the PAH degrading bacteria number compared to the non-planted soil. A temporal study of thermal desorption treated soil stored *in situ* showed a fast bacterial recolonization. Nevertheless, the quantity and diversity of the bacterial population were limited and showed little evolution with time. On the whole, these results highlight the necessity to precisely characterize the physico-chemical and the biological characteristics of the contaminated soils but also of the treated soils. The plant-micro-organisms association and especially MA fungi are certainly decisive for the remediation and the restoration of the soils properties.



Service de la Scolarité  
Affaire suivie par Georges BILLANT

AVIS DU JURY SUR LA REPRODUCTION DE LA THESE SOUTENUE

Ecole Doctorale

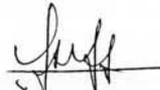
..... *Recherche Avancée Produits Chimiques* .....

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1 en

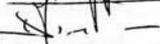
..... *Chimie* .....

Nom et prénom de l'auteur : *Maire Paule MORINI*  
Date de la soutenance : *15 novembre 2007*

Président du Jury - Nom, Prénom :

*MOREL Jean Louis* 

Membres du Jury - Nom, Prénom :

*van Tuinen, Diederik* 

*JONER, Erik*  
*C. LEYVAL* 

- Thèse pouvant être reproduite en l'état  
 Thèse pouvant être reproduite après corrections suggérées au cours de la soutenance  
 Thèse ne pouvant être reproduite

Le *15 novembre 2007*  
Le Président du Jury





Mademoiselle NORINI Marie-Paule

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en GEOSCIENCES

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER n° 1455

Nancy, le 26 novembre 2007

Le Président de l'Université

  
J.P. FINANCE







## RESUMÉ

De nombreux sites industriels présentent des contaminations multiples (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, Eléments en Traces Métalliques, métalloïdes) qui représentent un risque pour l'environnement et qui posent des problèmes pour leur traitement. Les techniques disponibles (ex. biopile, désorption thermique) diminuent la pollution organique, mais ne traitent pas la pollution métallique, et peuvent modifier les propriétés physico-chimiques et biologiques du sol. L'impact de ces modifications sur la capacité des plantes à se développer sur ces sols est peu étudié. La phytoremédiation, qui consiste à utiliser des plantes et les microorganismes associés pour réhabiliter des sols pollués, peut être une technique alternative ou complémentaire de traitement. Les objectifs de ce travail étaient (i) de caractériser les propriétés biologiques de sols contaminés et des mêmes sols ayant été traités par biopile et par désorption thermique, (i) d'évaluer l'effet de la mycorhization (*Glomus intraradices*) et de la fertilisation sur la capacité de la luzerne (*Medicago sativa* L.) à croître sur des sols avant et après remédiation (ii) d'étudier la dynamique des polluants dans la rhizosphère de ces plantes mycorhizées (*Glomus intraradices*) ou non et de caractériser les communautés microbiennes potentiellement impliquées et (iii) d'évaluer la recolonisation bactérienne d'un sol après un traitement par désorption thermique *in situ*.

Les sols étudiés proviennent de deux anciens sites industriels en Lorraine contaminés en HAP et dans une moindre mesure en ETM. La caractérisation des propriétés de ces sols montre des différences en terme de concentration en polluants, mais surtout des différences en terme de quantité et de structure des communautés microbiennes. Ainsi, la quantité de bactéries cultivables totales et dégradantes et le nombre de copies de gènes 16S et NDO, différent entre les sols contaminés mais sont plus faibles dans les sols traités par biopile et par désorption thermique. Des cultures de plantes en pots effectuées avec la luzerne inoculée ou non par un champignon MA et/ou fertilisée sur les différents sols ont montré que la survie et la croissance de la plante sur les sols contaminés et les sols traités étaient fortement dépendante de la mycorhization, sauf dans un sol traité par désorption thermique qui s'est révélé toxique pour la mycorhization. Dans ces expériences, si les teneurs en HAP ont diminué globalement par rapport aux sols initiaux pour toutes les modalités, c'est dans le sol non rhizosphérique que la concentration en HAP était la plus faible en fin d'expérience. Ce résultat suggère une diminution de la disponibilité des HAP dans la rhizosphère. L'inoculation par le champignon MA n'a pas eu d'effet sur la teneur en HAP, mais a réduit la concentration en ETM dans la plante. L'utilisation de différentes techniques (dénombrement, PCR-TTGE, PCR en temps réel) a montré l'impact des traitements de remédiation sur la microflore bactérienne et fongique du sol. Ainsi, dans le sol traité par désorption thermique, la présence de la plante augmente le nombre de bactéries dégradantes cultivables par rapport au sol non planté. Un suivi au cours du temps d'un sol traité par désorption thermique et stocké *in situ* a montré une recolonisation rapide mais une faible quantité de bactéries et une diversité bactérienne limitée, qui évoluent peu au cours du temps.

L'ensemble de ces résultats indique la nécessité de prendre en compte les caractéristiques physicochimiques et biologiques des sols contaminés mais aussi des sols traités. L'association plante-microorganismes et en particulier les champignons mycorhiziens sont certainement déterminants pour la remédiation et la restauration des propriétés de ces sols.